### OPIC

OFFICE DE LA PROPRIÉTÉ

INTELLECTUELLE DU CANADA



# (12)(19)(CA) Demande-Application

CIPO
CANADIAN INTELLECTUAL
PROPERTY OFFICE

(21)(A1) **2,274,092** 

(86) 1997/12/05 (87) 1998/06/11

RECEIVED

MAR 0 7 2001

TECH CENTER 1600/2900



(72) VON MELCHNER, Harald, DE

(71) VON MELCHNER, Harald, DE

(71) HÖLZER, Dieter, DE

(51) Int.Cl.<sup>6</sup> C12N 15/65, C12N 15/85, C12Q 1/68, C12N 5/16

(30) 1996/12/06 (196 50 714.6) DE

(54) PIEGE A GENES OBTENU PAR RECOMBINAISON POUR IDENTIFIER ET ISOLER DES GENES

(54) GENE-TRAPPING CONSTRUCT FOR THE IDENTIFICATION AND ISOLATION OF GENES

(57) La présente invention concerne un piège à gènes obtenu par recombinaison, contenant un premier gène marqueur qui, après activation, peut activer un deuxième gène marqueur. L'invention concerne également l'utilisation de ce piège à gènes pour identifier et/ou isoler des gènes, notamment des gènes exprimés de façon transitoire. La présente invention concerne en outre une cellule, de préférence une cellule de mammifère, contenant ledit piège à gènes. Elle concerne également l'utilisation de cette cellule pour identifier et/ou isoler des gènes, notamment des gènes transitoires. Elle concerne par ailleurs un vecteur contenant ledit piège à gènes, ainsi qu'un kit pour identifier et/ou isoler des gènes, notamment des gènes transitoires, ledit kit contenant ledit piège à gènes et ledit vecteur. L'invention concerne enfin un procédé pour identifier et/ou isoler des gènes, notamment des gènes transitoires.

(57) The relation relates to a gene trap construct containing a first reporter gene, which, after activation, can activate a second reporter gene, and the use of this gene trap construct for identification and/or isolation of genes, in particular transiently expressed genes. The invention relates further to a cell, preferably a mammal cell, containing the above-mentioned gene trap construct. The invention relates furthermore to the use of this mammal cell for identification and/or isolation of genes, in particular transient genes. In addition, the invention relates to a vector containing the above mentioned gene trap construction, as well as a kit for identifying and/or isolating genes, in particular transient genes, which contains at least the above-mentioned gene trap construct or the above-mentioned vector. Finally, the invention relates to a method for the identification and/or isolation of genes, in particular transient genes.

# WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM Internationales Büro



### INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6:

C12N 15/65, 15/85, 5/16, C12Q 1/68

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/24918

(43) Internationales

Veröffentlichungsdatum:

11. Juni 1998 (11.06.98)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/EP97/06816

A1

- (22) Internationales Anmeldedatum: 5. Dezember 1997 (05.12.97)
- (30) Prioritätsdaten:

196 50 714.6

- 6. Dezember 1996 (06.12.96) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): HÖLZER, [DE/DE]; Universitätsklinikum, Hämatologie, Theodor-Stern-Kai 7, D-60596 Frankfurt am Main (DE).
- (71)(72) Anmelder und Erfinder: VON MELCHNER, Harald [DE/DE]: Universitätsklinikum, Abteilung Hämatologie, Theodor-Stern-Kai 7, D-60596 Frankfurt am Main (DE).
- (74) Anwalt: GRÜNECKER, KINKELDEY, STOCKMAIR & SCHWANHÄUSSER; Maximilianstrasse 58, D-80538 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, CN, JP, KR, RU, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

### Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht.

Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt salls Anderungen

- (54) Title: GENE TRAP CONSTRUCT FOR IDENTIFICATION AND ISOLATION OF GENES
- (54) Bezeichnung: GENFALLEN-KONSTRUKT ZUR IDENTIFIZIERUNG UND ISOLIERUNG VON GENEN

### (57) Abstract

The relation relates to a gene trap construct containing a first reporter gene, which, after activation, can activate a second reporter gene, and the use of this gene trap construct for identification and/or isolation of genes, in particular transiently expressed genes. The invention relates further to a cell, preferably a mammal cell, containing the above-mentioned gene trap construct. The invention relates furthermore to the use of this mammal cell for identification and/or isolation of genes, in particular transient genes. In addition, the invention relates to a vector containing the above mentioned gene trap construction, as well as a kit for identifying and/or isolating genes, in particular transient genes, which contains at least the above-mentioned gene trap construct or the above-mentioned vector. Finally, the invention relates to a method for the identification and/or isolation of genes, in particular transient genes.

### (57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Genfallen-Konstrukt, das ein erstes Reportergen enthält, das nach Aktivierung ein zweites Reportergen aktivieren kann und die Verwendung dieses Genfallen-Konstrukts für eine Identifizierung und/oder Isolierung von Genen, insbesondere transient exprimierten Genen. Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin eine Zelle, vorzugsweise eine Säugetierzelle, die das oben genannte Genfallen-Konstrukt enthält. Die vorliegende Erfindung betrifft außerdem die Verwendung dieser Säugetierzelle für eine Identifizierung und/oder Isolierung von Genen, insbesondere transienten Genen. Weiterhin betrifft die Erfindung einen Vektor, der das oben genannte Genfallen-Konstrukt enthält, sowie einen Kit zur Identifizierung und/oder Isolierung von Genen, insbesondere transienten Genen, der mindestens das oben genannte Genfallen-Konstrukt oder den oben genannten Vektor enthält. Schließlich betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Identifizierung und/oder Isolierung von Genen, insbesondere transienten Genen.

### Gene-trapping construct for the identification and isolation of genes

The invention under consideration concerns a gene-trapping construct containing a first reporter gene which after activation can activate a second reporter gene, and the use of this gene-trapping construct for identification and/or isolation of genes, especially transiently expressed (transient) genes.

In addition the invention under consideration concerns a cell, preferably a mammalian cell, which contains the abovementioned gene-trapping construct. Besides this the invention under consideration concerns the use of this mammalian cell for identification and/or isolation of genes, particularly transient genes. Furthermore the invention concerns a vector containing the abovementioned gene-trapping construct, as well as a kit, containing at least the abovementioned gene-trapping construct or the abovementioned vector, for the identification and/or isolation of genes, particularly transient genes.

In conclusion the invention under consideration concerns a process for the identification and/or isolation of genes, particularly transient genes.

For some years one of the prime objectives of gene technology has been the isolation and identification of genes. For this there is available a whole range of procedures which have been directed in effect at the isolation and identification of permanently expressed genes.

The isolation and/or identification of genes which are expressed only transiently, as for example the genes responsible for programmed cell death, cell-cycle genes, DNA repair genes and differentiation-specific genes, is much more difficult.

To identify such genes in mammalian cells, where genetic analysis by the use of *Drosophila melanogaster* is unsuitable, a process has been developed which is based on the induction of gene fusions between a reporter gene without promotor and the control elements of a cellular gene via specific vectors, which are described as "gene traps" or "promotor traps". Various types of vector have been developed for insertion mutagenesis in mammals, whereby a reporter gene is inserted into the chromosome at a large number of places depending on chance, including in transcriptionally active areas. During selection for gene expression, clones are retained in which the

reporter gene is fused with the regulatory elements of an endogenous gene. In this way the vectors act as gene traps and provide a very helpful means for the analysis of gene function (Reviews in Hill & Wurst, 1993; Hill & Wurst 1993; von Melchner et al 1993; von Melchner & Ruley, 1995). In the majority of cases the gene-trapping vectors are transduced as recombinant retroviruses, although electroporated DNA is also used. The retroviruses display the advantage that they integrate in several areas throughout the entire genome and hence scarcely damage the neighbouring DNA (Varmus, 1988; Coffin et al., 1989; Goff, 1990; Sandmeyer et al., 1990; Withers/Ward et al., 1994).

It could be demonstrated that the gene traps are a practical means of analysing gene function in mice. Since totipotent mouse ES cells are used as cellular targets, mouse strains displaying inactivated gene function on account of mutations can be constructed. Unlike with gene splitting due to homologous recombination, the gene-trapping processes are not confined to genes, are sustainable for the cloned sequences and hence represent a process for the isolation and identification of genes as yet unknown.

Nevertheless, in order to identify and isolate genes which must first be induced in cells, that is, which are not continuously being transcribed, for example transient genes, such as genes responsible for programmed cell death, cell cycle genes, DNA repair genes and differentiation-specific genes, an additional process is necessary, in order conclusively to identify the transient cellular promotor captured in the gene trap, for instance through a durable signal independent of the promotor activity. Approximately 50% of the genes which are switched off in ES cell lines following infection/electroporation by gene-trapping vectors, manifest recessive phenotypes in mice (Friedrich and Soriano, 1991; Skarnes et al., 1992; von Melchner et al., 1992). This frequency is ten times greater than that observed following accidental insertion of retroviruses or microinjection of DNA (Gridley et al., 1987; Jaenisch et al., 1985). Due to this high efficiency of gene inactivation it appears sensible to isolate cell lines which display integration in most of the genes expressed (2-4 x 10<sup>4</sup>). It is not very practical, however, to transfer all mutations into the original line; furthermore many mutations result in genes of more limited significance. Consequently it would be desirable to exchange mutagenized ES cell clones for mutations relevant to important biological processes or genes.

With reference to this, those strategies are especially suitable which involve the preliminary selection of ES cell clones from interesting in vitro mutations, and for this employ a reporter gene to identify mutations e.g. in differentiation-specific genes. Although cultivated ES cells might have expressed genes which are not expressed in vivo, in 12 cases fusion genes were found which were expressed in ES cells as well as in embryos (De Gregory et al., 1994; Reddy et al., 1992). It further appears to be the case that a change in the expression of fusion genes during differentiation in vitro very closely predicts the change in expression during in vivo development (Reddy et al., 1992). This is in general agreement with earlier observations, in which in vitro-regulated genes were also strictly regulated in vivo (Muthuchamy et al., 1993; Rappotee et al., 1988; Rogers et al., 1991; Scholer et al., 1990; Sharpe et al., 1990).

It was therefore intended according to the invention under consideration to prepare a gene-trapping construct which made possible the isolation and identification of genes, especially transient genes, in a particularly advantageous way. A further purpose in respect to the invention under consideration was to provide a cell as well as a vector which maintained this gene-trapping construct, together with a kit for the identification and/or isolation of genes.

In conclusion, it was an intention according to the invention under consideration to present a process for the identification and/or isolation of genes, especially transient genes.

These purposes are satisfied by the conditions of the independent Claims 1, 17 and 22, the Claims regarding a cell 19, a vector, 24, a kit, 25, and the process claim 26.

The preferred types of operation with respect to the invention under consideration are presented in the claims below.

A "reporter gene" here signifies a nucleic acid sequence which gives rise on transcription to a recognizable signal such as for example a protein product. The "first" reporter gene is regulated through cellular transcription signals in whose neighbourhood it is integrated. Once the first reporter gene is activated, the first reporter gene product leads to activation of the "second" reporter gene, in which this second activation is permanent, that is, independent of the transcriptional activity of the DNA region controlling the first reporter gene. The second reporter gene codes for a demonstrable gene product, such as for example an enzyme, demonstrable by a colour reaction, or a growth factor, which can then be s lected for. The result of the combination of first and second

reporter genes is that even an only transiently expressed promotor can be indicated by means of a permanent signal, the second reporter gene product. The first and second reporter genes may exist in a common construct, or they may be available in various devices present in various places in the cell. The gene-trapping construct according to the invention is consequently here in principle a combination of a conventional gene-trapping construct, such as for example that described in US 5364783, corresponding to the first reporter gene construct, and a further device which can provide a permanent product independently of the promotor activity, in the present instance the second reporter gene construct.

According to Claim 1 of the invention under consideration, a gene-trapping construct is presented containing a first reporter gene which following activation can activate a second reporter gene. The first reporter gene preferably codes for a recombinase, such that this recombinase is in particular preferentially Cre or Flp.

In a favoured operational form the second reporter gene may code for a protein factor, in a further favoured operational form the second reporter gene codes for IL-3 and in a particularly favoured further operational form for E. coli beta-galactosidase (lacZ).

The second reporter gene is preferably activated by deletion by the recombinase of a DNA fragment situated next to the second reporter gene, which thereby places the second reporter gene immediately downstream of a promotor permanently under its control.

The deleted DNA fragment may preferentially be an antibiotic-resistance gene, by means of which the deleted DNA fragment codes in a particularly favoured operational form for thymidine kinase-neomycin phosphotransferase fusion protein, and in a further particularly favoured operational form codes for a neomycin phosphotransferase.

The promotor before which the second reporter gene is placed is preferably the phosphoglycerate kinase promotor.

In a favoured operational form the deleted DNA fragment is flanked by sequences, which may for example be loxP or frt, targeted by the recombinase. A possibility also exists that the target sequences may be located in the U3 and/or the U5 region.

The gene-trapping construct described above can be used for identification and/or isolation of genes, particularly transient genes. Included under this particularly is the isolation and/or identification of genes responsible for programmed cell death, cell cycle genes, DNA repair genes and differentiation-specific genes.

The invention under consideration furthermore provides for a cell, preferably a mammalian cell, containing a gene-trapping construct such as that described above.

In a favoured operational form the mammalian cell is dependent on IL-3 and contains a genetrapping construct in which the first reporter gene codes for Cre recombinase, whereby the Cre recombinase can delete a DNA fragment situated before the second reporter gene, where the deleted fragment codes for a thymidine kinase-neomycin phosphotransferase fusion protein and is flanked by loxP target sequences, and where the second reporter gene codes for IL-3 and following deletion of the thymidine kinase-neomycin phosphotransferase fusion protein gene comes to lie immediately downstream of the phosphoglycerate kinase promotor.

It is especially preferred that the mammalian cell is a growth factor-dependent haematopoietic precursor cell (e.g. FDCP1) or a totipotent embryonic stem cell.

According to the invention under consideration the mammalian cell can be used for identification and/or isolation of genes, especially transient genes, by which means particularly identification and/or isolation of the genes responsible for programmed cell death, of cell cycle genes, DNA repair genes and differentiation-specific genes is favoured.

Furthermore the invention under consideration provides for a vector containing the gene-trapping construct described above.

In addition a kit for the identification and/or isolation of genes, particularly transient genes, is proposed, containing at least one gene-trapping construct such as is described above.

Preferably the kit contains two constructs, by which the first construct contains the first reporter gene and the second construct the second reporter gene.

The kit may also contain a vector such as described above.

In conclusion, the invention under consideration provides a process for the identification and isolation of genes, especially transient genes, which contains the following steps:

- Installation of a gene-trapping construct as described above, in a suitable cell;
- Selection of cells in which the first reporter gene is incorporated in a gene, preferably an inactive gene;
- Activation of the first reporter gene, preferably by initiation of transcription of the inactive gene,
   in consequence of which the second reporter gene is activated;
- Identification and/or isolation of the gene in which the first reporter gene is incorporated.
- In a favoured operational form the process described above is characterized thereby, that
- a gene-trapping construct such as described above contains as first reporter gene the Cre
  recombinase gene, and that the Cre recombinase deletes a thymidine kinase-neomycin
  phosphotransferase gene situated upstream of the second reporter gene, through which the
  second reporter gene, which codes for IL-3, comes under the control of a phosphoglycerate
  kinase promotor,
- the gene-trapping construct is inserted into an IL-3-dependent FDCP-1 cell.
- through culture in neomycin- (e.g. G 418-)containing medium cells are selected for which do not produce Cre recombinase,
- these selected cells are cultivated in IL-3-free medium so that the genes responsible for programmed cell death are activated,
- that the surviving cells are selected out and
- the genes responsible for programmed cell death are isolated by the customary procedures.

- In a further favoured operational form the process is thereby characterized, that
- a gene-trapping construct, as described above, contains the Cre recombinase gene as first
  reporter gene, and that the Cre recombinase deletes a neomycin phosphotransferase gene
  situated upstream of the second reporter gene, through which the second reporter gene, which
  codes for lacZ, comes under the control of a phosphoglycerate kinase promotor,
- the gene-trapping construct is inserted into a totipotent embryonic stem cell,
- through cultivation on G418 cells are selected for which do not produce Cre recombinase,
- these selective cells are induced to differentiate, so that differentiation-specific genes are activated,
- these cells are isolated.
- these cells are introduced into the germ line of a mammal and are responsible there for the shaping of tissues, and
- the differentiation-specific genes are isolated by the customary procedures.

The abovementioned process for the isolation of the genes responsible for programmed cell death is for this reason especially appropriate, since through permanent replacement of selection markers by a gene trap expressing Cre recombinase, they are converted through activation in essentially dying cells of the endogenous cytokine production into multiplying cells. This permits selection for integration into genes which are active during the programmed cell death. Expression of the selection marker, for instance IL-3, is disassociated from the expression of the localized gene (in the gene trap) by which the recombinase brings the selection marker behind the phosphoglycerate kinase promotor. This is especially important as it is improbable that cells should go on expressing the genes responsible for programmed cell death. Finally, the process according to the invention under discussion is not confined to strongly expressed genes, and the gene representation is very much more uniform than for example in cDNA cloning. Furthermore the use of gene traps for isolation and/or identification, unlike differential RT-PCR amplification, is well reproducible, avoids redundancy and even enables quantification. In conclusion, the gene trap proviruses are regularly

located in or near the 5' exon and have the same transcriptional orientation relating to the gene, and this clearly facilitates cloning.

In any case characterization of the cellular transcripts induced by IL-3 withdrawal makes possible deeper insights into the complex molecular changes taking place during programmed cell death.

In a further favoured operational form a totipotent cell, which in itself can develop into an entire organism, contains a construct whereby the first reporter gene codes for a Cre recombinase which can delete a fragment situated before the second reporter gene, whereby the deleted fragment codes for neo and is flanked by loxP target sequences, and the second reporter gene codes for lacZ which following deletion of neo comes to lie immediately downstream of pgk.

The appended figures should explain the invention under discussion:

<u>Figure 1</u> shows the process relating to the invention in a schematic representation of two favoured operational forms.

- (A) Activation mechanism of the endogenous IL-3 secretion in FLOXIL-3 cells after IL-3 withdrawal. Integration of a U3-Cre gene trap into an originally unexpressed apoptosis gene is transiently activated by IL-3 withdrawal (left). Through site-specific recombination of the reporter plasmid ppgklxtkneoIL3 the tkneo gene is eliminated and the IL-3 gene is placed immediately downstream of the pgk promotor. This results in sustained IL-3 synthesis which continues even after switching off of the gene captured in the gene trap.
- (B) Activation mechanism of the lacZ gene during differentiation of -pln13- totipotent embryonic stem cells. A U3-Cre gene trap integration into an originally unexpressed differentiation gene is transiently activated during the differentiation. Through site-specific recombination of the reporter plasmid ppgklxneoLacZ the LacZ gene is placed immediately downstream of the pgk promotor. This results in sustained synthesis of beta-galactosidase, which continues even after switching off of the gene captured in the gene trap.

<u>Figure 2</u> shows a schematic overview of a process for the isolation and analysing of inducible differentiation genes from embryonic stem cells.

<u>Figure 3</u> shows the Cre/loxP-mediated recombination of the ppgklxtkneolL3 plasmid in FLOXIL-3 cells with U3-Cre-gene trap integrations in expressed genes.

(A) Structure of ppgklxtkneolL3 before and after recombination.

(B) Southern-Blot analysis of autonomous and parental FLOXIL-3 cells. Genomic DNAs were cut with BamHI, fractionated in agarose gels and transferred on to nylon membranes. Hybridization followed with <sup>32</sup>P-labelled neo-(left) or pgk-specific probes. Lane 1: parental FLOXIL-3 cells; Lanes 2-6: autonomous clones 1-5. Molecular weights are expressed with the help of a 1-kb BRL scale.

<u>Figure 4</u> shows U3-Cre gene trap integrations and site-specific recombination in autonomous clones isolated after withdrawal of IL-3.

(Above) Expected structure of U3-Cre proviruses (left) and the recombined reporter plasmid (right). (Below) Southern-Blot analysis of clones isolated following IL-3 withdrawal from the U3-Cre/Floxil-3 integration bank. The genomic DNA of individual clones was cut with BamHI and treated as in the text of Figure 3. Hybridization followed with <sup>32</sup>P-labelled Cre- (left) or pgk- (right) specific probes. Lane 1, 26-11-1; lane 2, 26-11-3; lane 3, 26-11-4; lane 4, 26-11-5; lane 5, 26-11-6; lane6, 26-11-7; lane 7, 26-11-8; lane 8, 26-12-1; lane 9, 26-12-2; lane 10, 26-12-3; lane 11, 26-12-4; lane 12, 26-12-5. The probes illustrated are representative of the whole integration bank.

Figure 5 shows an investigation of the cell-provirus fusion transcript.

(Above) Transcript expected from U3-Cre gene-trap integration in expressed genes.

(Below) Northem-Blot analysis of cell-provirus fusion transcripts before and after serum withdrawal. Polyadenylated RNA (5 micrograms) was fractionated in formaldehyde-agarose geis and transferred on to nylon membranes. Hybridization followed with <sup>32</sup>P-labelled Cre- or GAPDH-specific probes. Odd numbers stand for RNAs, even numbers RNAs after 16-hour serum withdrawal. Lanes 5 and 6 contain RNA from a clone with a constitutively expressed U3-Cre integration.

<u>Figure 6</u> shows an investigation of cellular transcripts following IL-3 withdrawal. Polyadenylated RNA (5 micrograms per lane) was derived from FDCP-1 cells deprived of IL-3 for 0, 6 and 12 hours. Northern-Blots were constructed as in the text of Figure 5 and hybridized with <sup>32</sup>P-labelled 5' provirus-flanking sequences or GAPDH.

<u>Figure 7</u> shows the differentiation-regulated U3-Cre gene trap integrations into embryonic stem cells. 960 pools each of 150 cells were infected with the U3-Cre virus and selected in G418. Differentiation induction followed over 4 days.

(Left) X-Gal staining before (left) and after (right) induction of differentiation.

(Right) Southem-Blot analysis of the regulated clones. The genomic DNA was cut with BamHI and treated as in the text of Figure 3. Hybridization followed with <sup>32</sup>P-labelled Cre- (left) and pgk- (right) specific probes.

u = undifferentiated, d = differentiated.

Particulars of this are to be found in the Examples.

In the following the invention will be described in detail with the help of examples; the examples will not however be limited to the scope of the invention.

### **EXAMPLES**

### Example 1

### Construction of a reporter plasmid

Most of the components of the reporter plasmid ppgklxtkneolL-3 (phosphoglycerate transferase promotor, loxP target sequence, thymidine kinase-neomycin phosphotransferase fusion protein, IL-3 gene) were put together in p-Bluescriptll-KS as follows:

The sequences for the target sequence loxP were derived from pGEM30. A loxP site was inserted at first into the Bluescript Polylinker as an EcoRI/Psti fragment. Then pgk (phosphoglycerate kinase promotor, obtained from ppgkCAT) was ligated to the Xbal/BamHI recombination site of the polylinker and the thymidine kinase-neomycin phosphotransferase fusion gene was cloned in the EcoRV recombination site situated downstream. The IL-3 gene (as cDNA of mice, from pc-Multi-CSF) was first subcloned from pGEM30 in the EcoRI site of the polylinker flanking the loxP target sequence, then next the plasmid was cut with Clal/Sall and the endfilled ends were again ligated to remove an additional EcoRI site. IL-3-loxP was then recovered from pGEM30 as an Sall/Xhol fragment and cloned in the Bluescript Polylinker. A copy of the bovine growth hormone polyadenylation sequence (bpa) as Xbal/Aval fragment was cloned with blunt ends in the Clal site downstream of tkneo. In order to obtain ppgklxtkneoIL-3 a Xhol fragment containing the assembled sequences was cloned in pSBC2 upstream of an SV-40 polyadenylation site. Since this original construct still enabled translation of IL-3 from the dicistronic tkneo-IL-3 transcript, a second copy of

bpa with blunt ends was cloned in the Sall site of pSBCII in order to obtain the definitive ppgklxtkneoIL-3 reporter plasmid.

### Example 2

Construction of an FDCP1 reporter cell line expressing two selectable reporter genes flanked by loxP recombination targets

The FDCP1 haemopoietic precursor cells used are strictly dependent on IL-3 for their growth and initiate programmed cell death if this growth factor is withdrawn from the medium.

The FDCP1 cells were cultivated at concentrations of 2 x 10<sup>5</sup> cells per ml in Dulbeccos modified Eagle's medium (DMEM: Gibco) supplemented with 10% v/v foetal calf serum (High Clone Laboratories, Utah, USA) and 10ng/ml recombinant mouse IL-3 (Sandoz). The agar cultures were a mixture of equal volumes of double-strength DMEM supplemented with 40% (v/v) foetal calf serum (Hyclone) and 0.6% (w/v) Bactoagar (Difco) in twice-distilled water. A few cultures contained 5 muM ganciclovir (Syndex).

In order to obtain a cell line which is transformed by Cre recombinase into a factor-independent cell, FDCP1 cells were electroporated with the reporter plasmid ppgklxtkneoIL-3. The electroporation was carried out using a BioRad Gene Pulser (BioRad) following the instructions of the manufacturer. The recombinants were isolated in agar culture containing 0.6 mg/ml G418. After 10 days the developing clones were isolated and amplified in suspension cultures as described above. The ppgklxtkneoIL-3 (Figure 3A) consists of two selectable reporter genes arranged one after the other, which are transcribt from a pgk (phosphoglycerate kinase) promotor. The gene at the 5' end codes for an HSV2 thymidine kinase (Tk) neomycin phosphotransferase (neo) fusion protein and is flanked by two loxP recombination targets. The 3' end of the gene codes for mouse IL-3 and terminates in an SV40 polyadenylation sequence. To suppress the IL-3 translation of dicistronic transcripts, two consecutively arranged copies of the polyadenylation sequence of bovine growth hormone (bpa) were inserted downstream from tkneo. In this way one could assume that even cells which expressed ppgklxtkneoIL-3 were still always IL-3 dependent. Since the Cre recombinase typically excises those sequences that are flanked by direct repetitions of lox-P, it was assumed that expression of Cre deleted the tkneo gene and thereby placed the IL-3 gene

downstream of the pgk promotor. As a result the cells would lose their neomycin resistance and acquire factor independence through synthesis of IL-3.

Stable FDCP-1 transformants were selected in G418 and five clonal cell lines were isolated from the agar cultures. A cell line expressing a single-copy plasmid and in addition identified as FLOXIL-3 was selected for further analysis.

It was first established whether the FLOXIL-3 cells were still dependent for their growth on IL-3, by plating out  $5 \times 10^7$  cells at a concentration of  $2 \times 10^5$  per ml in half-set agar cultures without IL-3. Since no colonies developed within 10 days, it was assumed that neither limited IL-3 translation nor spontaneous recombination had occurred inside these cells.

Further to confirm this, FLOXIL-3 and parental FDCP-1 cells were pre-incubated in agar cultures without IL-3 for up to 24 hours and finally rescued by giving IL-3. Both cell types initiated programmed cell death with similar kinetics, which indicated that the expression of ppgklxtkneoIL-3 did not alter the cellular response to the factor withdrawal. Moreover most of the cells survived for more than 12 hours without IL-3 and so left enough time for the expression of the sequences transduced by the gene trap.

### Example 3

Construction of a gene trap which expresses Cre recombinase (U3-Cre) and renders FLOXIL-3 cells factor-independent

A U3-Cre gene-trap vector was derived from the pGgU3Neo(en-) vector based on MoMuLV, by means of which the neo gene in the U3 region was replaced with the sequence coding for Cre derived from pMCCre. The plasmid was transfected into helper cells, and the remainder of the cell line, which produced recombinant viruses in high titre, was used for infecting FLOXIL-3 cells. As already indicated earlier, the virus replication and LTR-mediated duplication of sequences inserted into U3 places precisely 30 nucleotides downstream of the flanking cellular DNA. This enables their expression through integrations into transcribed genes. It was expected from this that FLOXIL-3 cells with U3-Cre integrations in expressed genes would be transformed into factor-independent cells. In order to select for this occurrence, virus-infected FLOXIL-3 cells were plated out in agar cultures without IL-3. Many autonomously growing colonies were obtained and amplified in

suspension cultures. As was to be expicted from the expression of a recombinant reporter plasmid, all the clones lost their G418 resistance and grew without IL-3.

In order to verify the recombination, genome DNAs from five autonomous clones were digested with BamHI and analysed by Southern blotting. Since BamHI divides inside the 5' ends of pgk and IL-3, recombinant FLOXIL-3 cells do not replicate an internal fragment of 3.2 kb which hybridizes both with pgk- and with neo-specific probes (Figure 3A). Since this fragment contains all the sequences which are flanked by loxP, including tkneo, a deletion should be associated with a reduction in size of 2.6 kb. In fact all clones produced a 0.6 kb restriction fragment which did not hybridize with neo, which indicated that recombination had taken place (Figure 3B).

Furthermore, when analysed by Northern blotting all the clones expressed cell provirus transcripts, which indicated that the Cre recombinase of active cellular promotors was being expressed.

In this way FLOXIL-3 cells are obtained containing a gene-trapping construct which enables such genes as are reponsible for programmed cell death to be isolated and identified.

### Example 4

Construction of a U3-Cre/FLOXIL-3 integration bank and isolation of transiently expressed gene sequences

An integration bank consisting of 2 x 10<sup>6</sup> independent proviral integrations was constructed by infection of FLOXIL-3 cells with U3-Cre retroviruses. The infected cells were first preselected in G418 in order to eliminate complete integrations into expressed genes. Figure 4 shows that this goal was attained following 16 days' selection. Following plating out of a basic sample of the integration bank in agar culture without IL-3, altogether 110 autonomous clones could be isolated and amplified. Southern blot investigations have shown that all the clones displayed provirus integration and without exception contained recombinant reporter plasmids (Figure 4).

Northern blot investigations with mRNA from 11 independent autonomous clones show that in 9 clones cell-provirus fusion transcripts were either very weakly expressed or not at all (Figure 5, lanes 1, 3, 7, 9, 11, 13, 17, 19, 21). This means that the Cre recombinase was only transiently expressed sufficiently to cause recombination of the reporter plasmid. In addition more than 50% of

these fusion transcripts were inducible by serum withdrawal, which indicates, that the genes intercepted by the gene trap are associated with arrest of an apoptotic programme or of growth (Figure 5).

Finally the 5'-provirus-flanking sequences cloned by known processes (von Melchner et al., 1992) were hybridized with the mRNA of wild-type FDCP-1 cells on Northern blots. The majority of the probes investigated hybridized with IL-3-induced cellular transcripts (Figure 6). Whether these genes control the apoptosis directly or are part of other mechanisms which are activated as a result of the programmed cell death, still has to be established. In any case characterization of the cellular transcripts induced by the IL-3 withdrawal facilitates further insights into the complex molecular changes which emerge during programmed cell death.

The further precise identification and isolation of the discovered genes can be carried out by customary processes, such as for instance 3'RACE or the restoration of a gene library and cloning and sequencing of the genes discovered.

### Example 5

### Construction of an ES reporter cell line

In order to obtain an ES cell line suitable for a permanent selectable reporter exchange through Cre recombinase, D3 cells were electroporated with the reporter construct ppgklxneolacZ in which two reporter genes arranged one after the other were transcribed by a mouse phosphoglycerate kinase promotor. The reporter construct ppgklxneolacZ consists of the phosphoglycerate kinase promotor, the loxP target sequences, the neomycin phosphotransferase gene and a gene for lacZ. Its construction followed the pattern described above for construction of the reporter plasmid ppgklxtkneolL-3.

The 5' gene codes for neomycin phosphotransferase and is flanked by two loxP recombination targets in identical orientation. The 3' gene codes for beta-galactosidase and ends in an SV40 polyadenylation sequence. In order to suppress genomic transcripts ending in SV40-PolyA and in this way also to suppress the translation of lacZ, two consecutively positioned copies of the bovine growth hormone polyadenylation sequence (bpa) are inserted downstream of the neomycin phosphotransferase. Cells expressing ppgklxneolacZ should accordingly display a phenotype

resistant to neomycin phosphotransferase and negative for lacZ. In the case of Cre expression, however, the neo gene would be excised from the recombinase and the sequence coding for lacZ placed immediately downstream of the pgk promotor. As a result the cells which express the recombined reporter plasmid lose their neomycin resistance and stain positive with X-Gal (lacZ+).

Various ES cell lines expressing ppgklxneolacZ were isolated in G418 and tested individually on a background of X-Gal staining. Four of 10 cell lines did not stain regularly with X-Gal even after long periods of culture. If one induced these cell lines to differentiate in cultures containing no LIF (Leukaemia Inhibiting Factor) or nutrient layers, lacZ cells still stained negative, which indicated that the lacZ phenotype is stable. A cell line expressing a single copy of ppgklxneolacZ was selected for further analysis. In the following it is named pln13.

In order to establish whether the Cre recombinase converted the lacZ of pln13 into lacZ+, the cells were transfected with the Cre-expressing plasmid pMC-Cre. Unselected colonies were picked after 10 days and aliquots stained with X-Gal. Genomic DNA extracted from various lacZ+ cells was cut with BamHI and analysed by Southern blotting. In every case the lacZ phenotype was associated with a 2 kb deletion, which indicated that the reporter plasmid was subject to site-specific recombination.

### Example 6

### Expression of beta-galactosidase in pln13 cells through U3-Cre integration

5 x 10<sup>4</sup> pln13 cells were infected at MOI = 1 with U3-Cre virus constructed as described above. After incubation for 72 hours the cells were divided into 480 pools and seeded out in microtitre plates. After 48 hours aliquots were stained with X-Gal in order to detect integrations into active cells. Out of 20 pools containing lacZ+ cells three were seeded out at clonal density. Four positive clones were selectively isolated and analysed by Southern blotting. All clones contained 1-2 proviruses which agreed with an MOI = 1 and contained recombined reporter plasmids. Every clone in addition expressed cell-provirus fusion transcripts whose size in accordance with expectations varied around 100 to 500 nt.

In this way U3-Cre gene trap retroviruses effectively mediate site-specific recombinations on account of their integration into expressed genes.

### Example 7

### Isolation of clones with inducible U3-Cre-provirus integration

In order to establish whether the U3-Cre/loxP strategy is suitable for isolating genes which owing to differentiation are inducible, 1.5 x 10<sup>5</sup> pln13 cells were seeded out in the cups of 10 microtitre plates at concentrations of 150 cells per cup and infected with U3-Cre virus at about MOI = 1. In order to eliminate integration into active genes, cells were selected on G418 for 5 days. Then in the absence of either LIF (Leukaemia Inhibitory Factor) or MEF (Mouse Embryonic Fibroblasts) aliquots of each cup were induced to differentiate and stained with X-Gal. Forty-four out of 960 cups stained positive by this test. Following a further test 9 pools were lacZ+ in both presence and absence of LIF and MEF, while 35 pools changed to lacZ+ only following differentiation, which indicated that U3-Cre integration had occurred in the induced genes.

Figure 7 shows as an example three isolated clones with

U3-Cre-provirus integrations into differentiation-specific genes. The inducibility of the genes was attested by the phenotypic change from LacZ(-) (Figure 7A, undifferentiated cells, above left) to LacZ(+) (Figure 7A, differentiated cells, above right). The Southern Blots indicate that this change is based on site-specific recombination of the reporter plasmid, caused by the U3-Cre-provirus integration into inducible differentiation genes (Figure 7B).

In Figure 2 is shown an overview of an isolation of this kind. In the first step come infection with U3-Cre gene trap vector and selection on G418. The colonies obtained are divided into aliquots, induced to differentiate and stained with X-Gal. Only the stained clones are selected further, amplified and used in the construction of chimaeric mice. These mice may on the other hand be used to determine the LacZ distribution in the tissue, or to determine the phenotype of F2 mice and to isolate -/-ES- cells.

The corresponding cellular genes can be cloned from the known gene-trap sequences by conventional means.

In this manner the gene trapping construct according to the invention under consideration makes it possible to isolate and/or identify genes, in particular genes only transiently expressed.

Bibliography

(This is in English and occupies pages 22 and 23 of the text.)

### **Patent Claims**

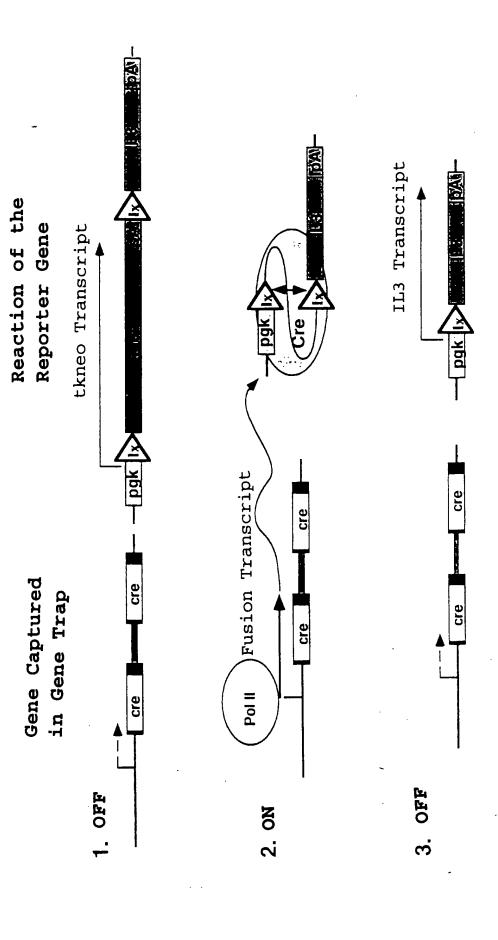
- 1. Gene-trapping construct, containing a first reporter gene, which after activation can activate a second reporter gene.
- 2. Gene-trapping construct according to Claim 1, characterized thereby that the first reporter gene codes for a recombinase.
- 3. Gene-trapping construct according to Claim 2, characterized thereby that the recombinase is Cre.
- 4. Gene-trapping construct according to Claim 2, characterized thereby that the recombinase is Flp.
- 5. Gene-trapping construct according to one or more of the foregoing Claims, characterized thereby that the second reporter gene codes for a protein factor.
- 6. Gene-trapping construct according to Claim 5, characterized thereby that the second reporter gene codes for IL-3.
- 7. Gene-trapping construct according to Claim 5, characterized thereby that the second reporter gene codes for LacZ.
- 8. Gene-trapping construct according to one or more of Claims 2 to 7, characterized thereby that the second reporter gene is activated thereby, that the recombinase deletes a DNA fragment located before the second reporter gene and in that way places the second reporter gene downstream from a promotor under its control.
- 9. Gene-trapping construct according to Claim 8, characterized thereby that the deleted fragment is an antibiotic-resistance gene.
- 10. Gene-trapping construct according to Claim 9, characterized thereby that the deleted DNA fragment codes for a thymidine kinase-neomycin phosphotransferase fusion protein.
- 11. Gene-trapping construct according to Claim 10, characterized thereby that the deleted DNA fragment codes for a neomycin phosphotransferase.

- 12. Gene-trapping construct according to Claim 9, 10 or 11, characterized thereby that the promotor is the phosphoglycerate kinase (pgk) promotor.
- 13. Gene-trapping construct according to one or more of the Claims 8 to 12, characterized thereby that the deleted DNA fragment is flanked by target sequences for the recombinase.
- 14. Gene-trapping construct according to Claim 13, characterized thereby that the target sequence is loxP.
- 15. Gene-trapping construct according to Claim 13, characterized thereby that the target sequence is frt.
- 16. Gene-trapping construct according to Claim 13, 14 or 15, characterized thereby that the target sequence is located in the U3 and/or the U5 region.
- 17. Use of the gene-trapping construct according to one or more of the foregoing Claims for identification and/or isolation of genes, in particular transient genes.
- 18. Use according to Claim 17 for identification and/or isolation of genes controlling programmed cell death, DNA repair, differentiation and/or the cell cycle.
- 19. Cell, preferably a mammalian cell, containing a gene-trapping construct according to one or more of Claims 1 to 15.
- 20. Mammalian cell according to Claim 19, characterized thereby that it is dependent on IL-3, that the first reporter gene codes for Cre recombinase, that the Cre recombinase can delete a DNA fragment located before the second reporter gene, that the deleted fragment codes for a thymidine kinase-neomycin transferase fusion protein (TKNeoPT) and is flanked by loxP target sequences, that the second reporter gene codes for IL-3 and following deletion of the TKNeoPT gene comes to lie downstream of the phosphoglycerate kinase promotor.
- 21. Mammalian cell according to claim 20, characterized thereby that it is a haemopoietic FDCP-1 cell or a totipotent stem cell.

- 22. Use of the mammalian cell according to Claim 19 for identification and/or isolation of genes, in particular transient genes.
- 23. Use of the mammalian cell according to Claim 19 or 20 or 21 for identification and/or isolation of the genes controlling programmed cell death, DNA repair, differentiation and/or the cell cycle.
- 24. Vector containing the gene-trapping construct according to one or more of Claims 1 to 16.
- 25. Kit for identification and/or isolation of genes, in particular transient genes, containing at least one gene- trapping construct according to Claims 1 to 16 and/or a vector according to Claim 24.
- 26. Process for the identification and/or isolation of genes, particularly transient genes, comprising the following steps:
- Introduction of a gene-trapping construct according to one of the Claims 1 to 16 into a suitable cell;
- Selection of cells in which the first reporter gene is incorporated in a gene, preferably an inactive gene;
- Activation of the first reporter gene, preferably through initiation of transcription of the gene, in consequence of which the second reporter gene is activated; and
- · Identification and/or isolation of the gene in which the first reporter gene is incorporated.
- 27. Process according to Claim 26, characterized thereby that
- a gene-trapping construct according to Claim 8 contains as first reporter gene the Cre
  recombinase gene, that the Cre recombinase deletes a thymidine kinase-neomycin
  phosphotransferase gene situated downstream from the second reporter gene, whereby the
  second reporter gene, which codes for IL-3, comes under the control of a phosphoglycerate
  kinase promotor,
- the gene-trapping construct is inserted into an IL-3-dependent FDCP-1 cell, -

- through culture in a n omycin medium cells which do not produce Cre recombinase are selected,
- these selected cells are cultivated in IL-3-free medium, so that the genes responsible for programmed cell death are activated,
- that the surviving cells are selected out, and
- the genes responsible for programmed cell death are isolated by the customary procedures.
- 28. Process according to Claim 26, characterized thereby that
- a gene-trapping construct according to Claim 8 contains the Cre recombinase gene as first reporter gene, that the Cre recombinase deletes a neomycin phosphotransferase gene located downstream from the second reporter gene, whereby the second reporter gene, which codes for lacZ, comes under the control of a phosphoglycerate kinase promotor,
- · the gene-trapping construct is inserted into a totipotent embryonic stem cell,
- through culture in G418, cells which do not produce Cre recombinase are selected,
- these selected cells are induced to differentiate, so that differentiation-specific genes are activated,
- · these cells are isolated,
- these cells are introduced into the germ line of a mammal and are there responsible for the formation of tissues and
- the differentiation-specific genes are isolated by the customary procedures.

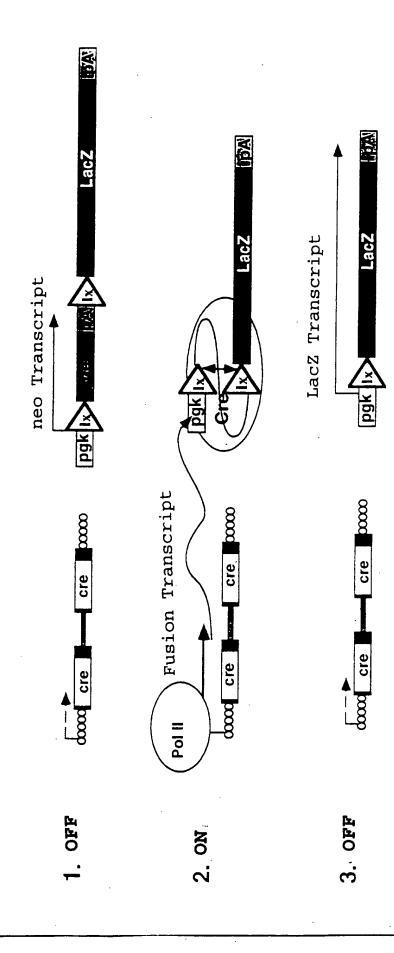
FIGURE 1A

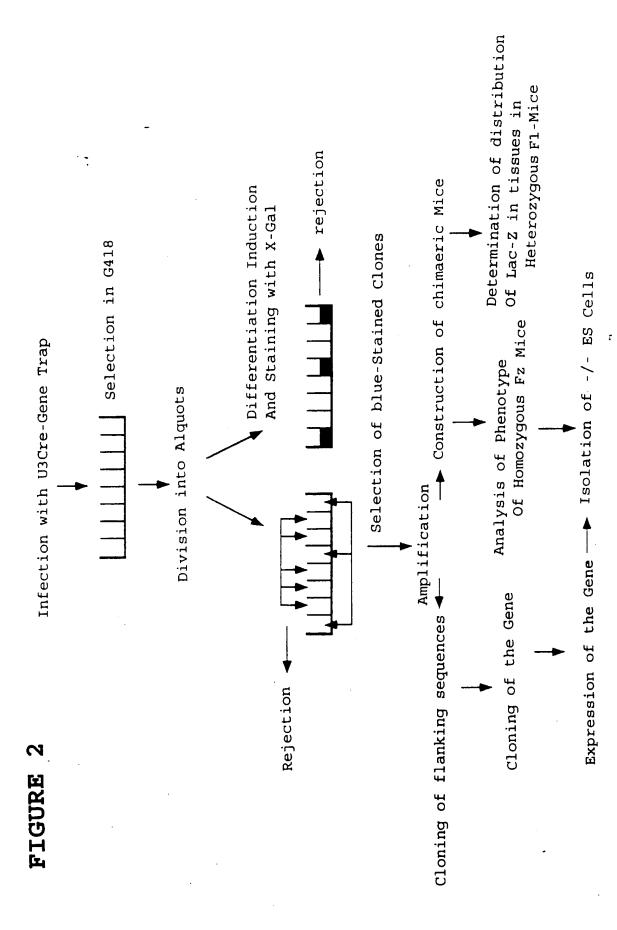


# FIGURE 1E

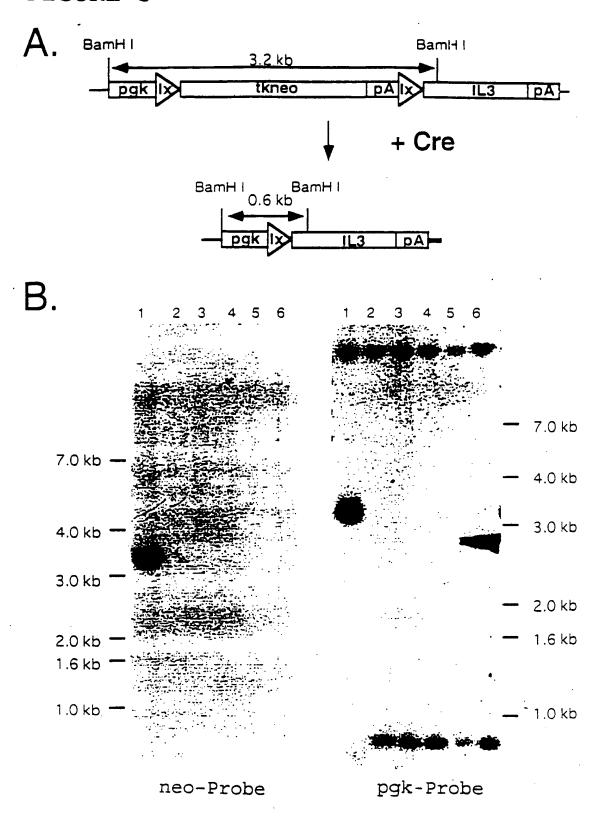
Gene Captured in Gene Trap

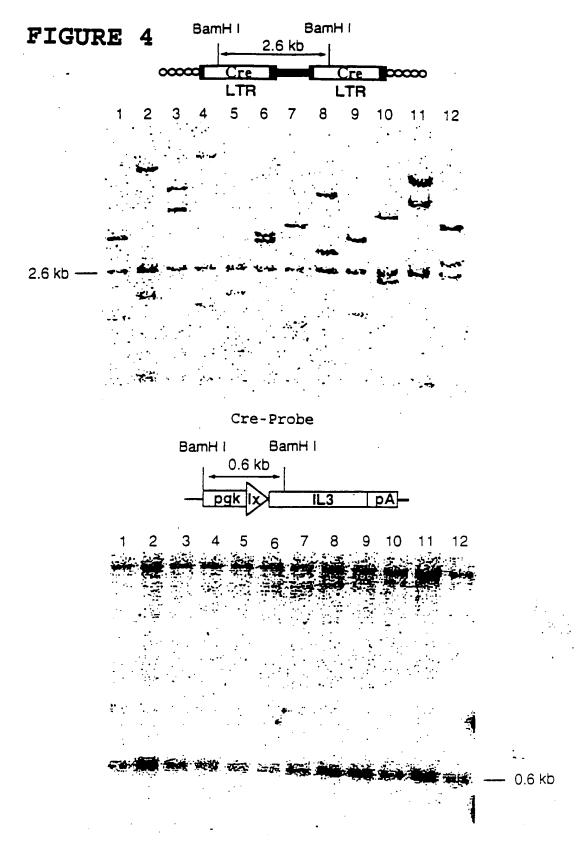
Reaction of the Reporter Gene



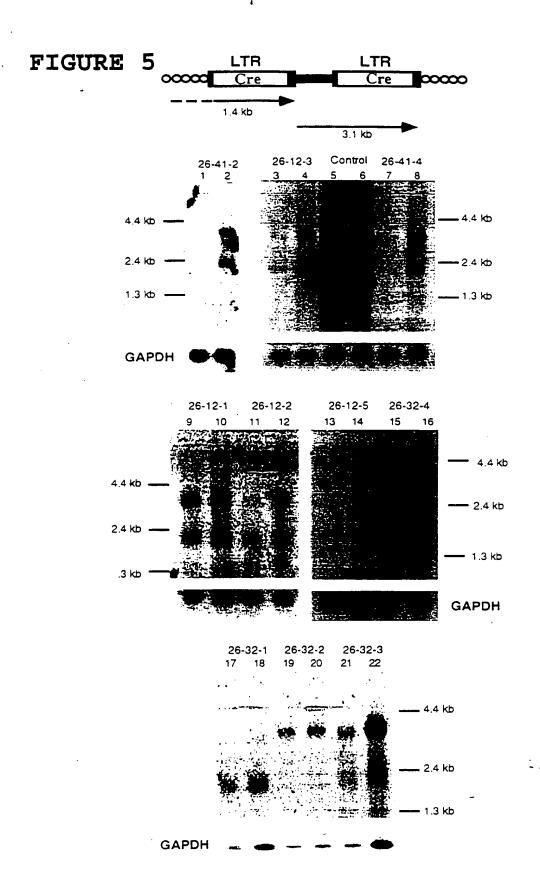


# FIGURE 3

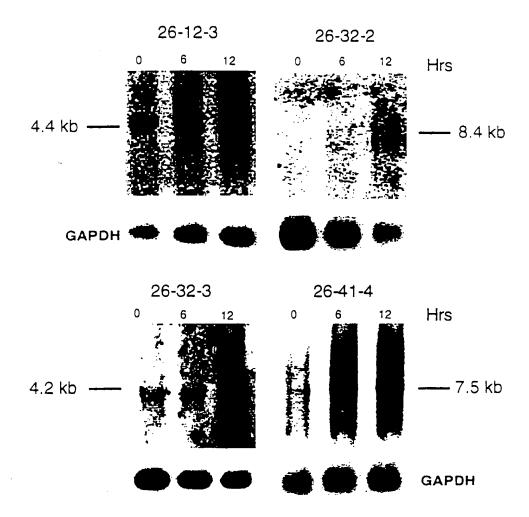




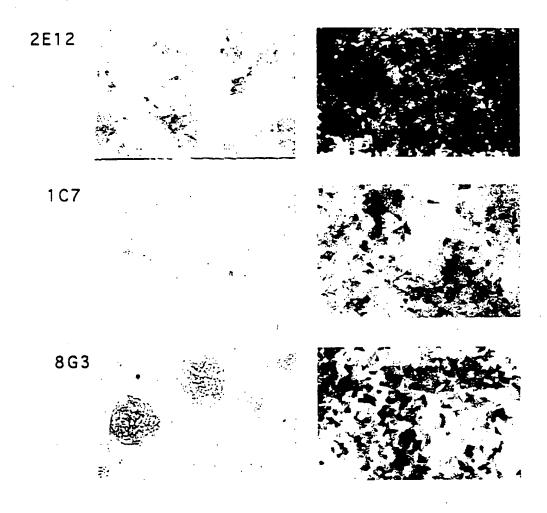
pgk-Probe



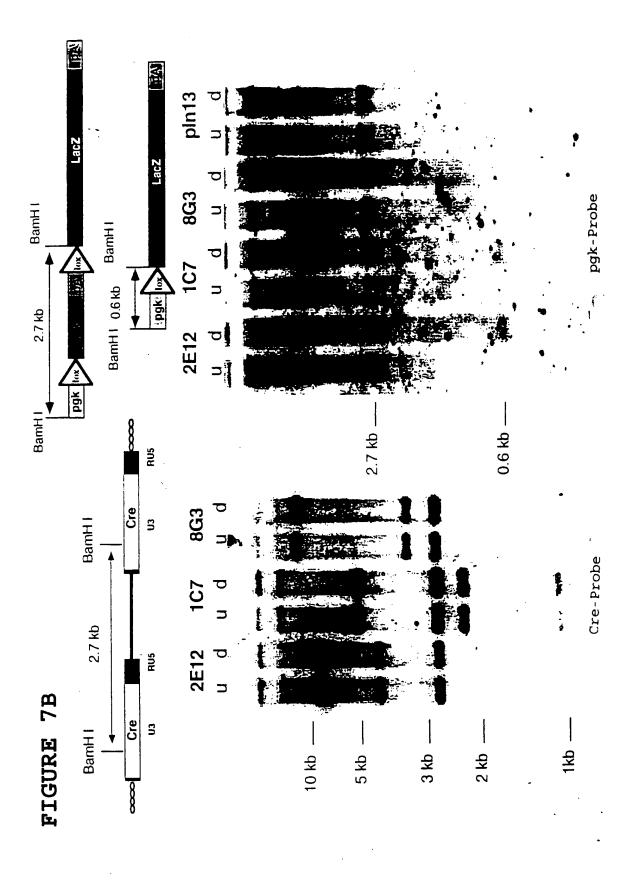
# FIGURE 6



### FIGURE 7A



l



PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6:

C12N 15/65, 15/85, 5/16, C12Q 1/68

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer:

WO 98/24918

A1

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:

11. Juni 1998 (11.06.98)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/EP97/06816

- (22) Internationales Anmeldedatum: 5. Dezember 1997 (05.12.97)
- (30) Prioritätsdaten:

196 50 714.6

6. Dezember 1996 (06.12.96)

DE

- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): HÖLZER, Abteilung [DE/DE]; Universitätsklinikum, Hämatologie, Theodor-Stem-Kai 7, D-60596 Frankfurt am Main (DE).
- (71)(72) Anmelder und Erfinder: VON MELCHNER, Harald [DE/DE]; Universitätsklinikum, Abteilung Hämatologie, Theodor-Stern-Kai 7, D-60596 Frankfurt am Main (DE).
- (74) Anwalt: GRÜNECKER, KINKELDEY, STOCKMAIR & SCHWANHÄUSSER; Maximilianstrasse 58, D-80538 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, CN, JP, KR, RU, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

### Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht.

Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen

- (54) Title: GENE TRAP CONSTRUCT FOR IDENTIFICATION AND ISOLATION OF GENES
- (54) Bezeichnung: GENFALLEN-KONSTRUKT ZUR IDENTIFIZIERUNG UND ISOLIERUNG VON GENEN

### (57) Abstract

The relation relates to a gene trap construct containing a first reporter gene, which, after activation, can activate a second reporter gene, and the use of this gene trap construct for identification and/or isolation of genes, in particular transiently expressed genes. The invention relates further to a cell, preferably a mammal cell, containing the above-mentioned gene trap construct. The invention relates furthermore to the use of this mammal cell for identification and/or isolation of genes, in particular transient genes. In addition, the invention relates to a vector containing the above mentioned gene trap construction, as well as a kit for identifying and/or isolating genes, in particular transient genes, which contains at least the above-mentioned gene trap construct or the above-mentioned vector. Finally, the invention relates to a method for the identification and/or isolation of genes, in particular transient genes.

### (57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Genfallen-Konstrukt, das ein erstes Reportergen enthält, das nach Aktivierung ein zweites Reportergen aktivieren kann und die Verwendung dieses Genfallen-Konstrukts für eine Identifizierung und/oder Isolierung von Genen, insbesondere transient exprimierten Genen. Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin eine Zelle, vorzugsweise eine Säugetierzelle, die das oben genannte Genfallen-Konstrukt enthält. Die vorliegende Erfindung betrifft außerdem die Verwendung dieser Säugetierzelle für eine Identifizierung und/oder Isolierung von Genen, insbesondere transienten Genen. Weiterhin betrifft die Erfindung einen Vektor, der das oben genannte Genfallen-Konstrukt enthält, sowie einen Kit zur Identifizierung und/oder Isolierung von Genen, insbesondere transienten Genen, der mindestens das oben genannte Genfallen-Konstrukt oder den oben genannten Vektor enthält. Schließlich betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Identifizierung und/oder Isolierung von Genen, insbesondere transienten Genen.

## LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	31	Siowerien	
AM	Armenicn	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei	
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal	
ΑU	Australien	GA	Gabun	LV ·	Lettland	SZ	Swasiland	
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad	
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo	
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan	
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische	TM	Turkmenistan	
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland		Republik Mazedonien	TR	Türkei	
BG	Bulgarien	HU	Ungam	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago	
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolci	UA	Ukraine	
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda	
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von	
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		Amerika	
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan	
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam	
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen .	YU	Jugoslawien	
CI	Côte d'Ivoire	KР	Demokratische Volksrepublik	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe	•
CM	Kanierun		Korea	PL	Polen			
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal			
CU	Kuba	ΚZ	Kasachstan	RO	Rumänien			
CZ	Tschechische Republik	I.C	St. Lucia	RU	Russische Föderation			
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan			
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden			
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		•	
26	201101-0	3.						

PCT/EP97/06816

# Genfallen-Konstrukt zur Identifizierung und Isolierung von Genen

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Genfallen-Konstrukt, das ein erstes Reportergen enthält, das nach Aktivierung ein zweites Reportergen aktivieren kann und die Verwendung dieses Genfallen-Konstrukts für eine Identifizierung und/oder Isolierung von Genen, inbesondere transient exprimierten (transienten) Genen.

Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin eine Zelle, vorzugsweise eine Säugetierzelle, die das oben genannte Genfallen-Konstrukt enthält. Die vorliegende Erfindung betrifft außerdem die Verwendung dieser Säugetierzelle für eine Identifizierung und/oder Isolierung von Genen, insbesondere transienten Genen. Weiterhin betrifft die Erfindung einen Vektor, der das oben genannte Genfallen-Konstrukt enthält, sowie einen Kit zur Identifizierung und/oder Isolierung von Genen, insbesondere transienten Genen, der mindestens das oben genannte Genfallen-Konstrukt oder den oben genannten Vektor enthält.

Schließlich betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Identifizierung und/oder Isolierung von Genen, insbesondere transienten Genen.

Seit einigen Jahren ist es eines der vorrangigen Ziele der Gentechnologie, Gene zu isolieren und zu identifizieren. Hierfür stehen eine ganze Reihe von Verfahren zur Verfügung, die im wesentlichen darauf gerichtet sind, permanent exprimierte Gene zu isolieren bzw. zu identifizieren.

Sehr viel schwieriger ist die Isolierung und/oder Identifizierung von Genen, die nur transient exprimiert werden, wie z.B. für den programmierten Zelltod verantwortliche Gene, Zellzyklusgene, DNA-Reparaturgene und differenzierungsspezifische Gene.

Um solche Gene in Säugetierzellen zu identifizieren, wo genetische Analysen unter Verwendung von *Drosophila melanogaster* ungeeignet sind, wurde ein Verfahren entwickelt, das auf der Induktion von Genfusionen zwischen einem Reportergen ohne Promotor und den Kontrollelementen eines zellulären Gens

durch spezifische Vektoren beruht, die als "Genfallen" oder auch "Promotorfallen" bezeichnet werden. Es sind verschiedene Arten von Vektoren für die Insertionsmutagenese bei Säugetieren entwickelt worden, die ein Reportergen in einer großen Anzahl von zufallsabhängigen Stellen in dem Chromosom inserieren, einschließlich in transkriptionell aktive Bereiche. Indem auf Genexpression selektiert wird, werden Klone erhalten, in denen das Reportergen mit den regulatorischen Elementen eines endogenen Gens fusioniert ist. Auf diese Weise arbeiten die Vektoren als Genfallen und stellen ein sehr hilfreiches Mittel bei der Analyse der Genfunktion dar (Reviews in Hill & Wurst, 1993; Hill & Wurst 1993; von Melchner et al. 1993; von Melchner & Ruley, 1995). In den meisten Fällen werden die Genfallenvektoren als rekombinante Retroviren transduziert, obwohl auch elektroporierte DNA verwendet wurde. Die Retroviren weisen den Vorteil auf, daß sie in weiten Bereichen über das gesamte Genom integrieren, wobei sie die benachbarte DNA kaum schädigen (Varmus, 1988; Coffin et al., 1989; Goff, 1990; Sandmeyer et al., 1990; Withers/Ward et al., 1994).

Es konnte gezeigt werden, daß die Genfallen ein wirksames Mittel für die Analyse der Genfunktionen in Mäusen sind. Indem totipotente Maus-ES-Zellen als zelluläre Ziele verwendet werden, können Maus-Stämme konstruiert werden, die inaktivierte Genfunktionen aufgrund von Mutationen aufweisen. Anders als bei der Genaufspaltung durch homologe Rekombination sind die Genfallen-Verfahren nicht auf Gene beschränkt, für die klonierte Sequenzen erhältlich sind und stellen daher ein Verfahren dar, um noch unbekannte Gene zu isolieren und zu identifizieren.

Um jedoch Gene zu identifizieren und zu isolieren, die in Zellen erst induziert werden müssen, d.h. nicht ständig transkribiert werden, z.B. transiente Gene, wie z.B. Gene, die für den programmierten Zelltod verantwortlich sind, Zellzyklusgene, DNA-Reparaturgene und differenzierungsspezifische Gene, ist ein zusätzliches Verfahren notwendig, um den in der Genfalle gefangenen zellulären transienten Promotor zuverlässig zu identifizieren, beispielsweise durch ein von der Promotoraktivität unabhängiges, dauerhaftes Signal. Ungefähr 50 % der Gene,

die in ES-Zellinien nach einer Infektion/Elektroporation durch Genfallen-Vektoren unterbrochen sind, erzeugen rezessive Phänotypen bei Mäusen (Friedrich und Soriano, 1991; Skarnes et al., 1992; von Melchner et al., 1992). Diese Häufigkeit ist zehnmal größer als die, die nach einer Zufallsinsertion von Retroviren oder mikroinjizierter DNA beobachtet wird (Gridley et al., 1987; Jänisch et al., 1985). Basierend auf dieser hohen Effizienz der Geninaktivierung erscheint es sinnvoll, Zellinien zu isolieren, die Integrationen in den meisten exprimierten Genen (2-4 x 10<sup>4</sup>) aufweisen. Es ist jedoch wenig praktisch, alle Mutationen in die Stammlinie zu übertragen; außerdem betreffen viele Mutationen Gene von geringerer Bedeutung. Deshalb wäre es wünschenswert, mutagenisierte ES-Zellklone für Mutationen auszuwählen, die wichtige biologische Prozesse oder Gene betreffen.

Im Hinblick darauf sind besonders diejenigen Strategien geeignet, die eine Vorauswahl von ES-Zellklonen auf interessante Mutationen in vitro involvieren, und dafür ein Reportergen verwenden, um Mutationen in z.B. differenzierungsspezifischen Genen zu identifizieren. Obwohl gezüchtete ES-Zellen prinzipiell Gene exprimieren könnten, die in vivo nicht exprimiert werden, wurden in 12 Fällen Fusionsgene gefunden, die sowohl in ES-Zellen als auch in Embryos exprimiert wurden (De Gregory et al., 1994; Reddy et al., 1992). Es scheint weiterhin so zu sein, daß ein Wechsel in der Expression von Fusionsgenen während der Differenzierung in vitro sehr genau den Wechsel in der Expression während der in vivo-Entwicklung vorhersagt (Reddy et al., 1992). Dies stimmt mit früheren Beobachtungen überein, bei denen in vitro-regulierte Gene auch in vivo streng reguliert waren (Muthuchamy et al., 1993; Rappotee et al., 1988; Rogers et al., 1991; Scholer et al., 1990; Sharpe et al., 1990).

Es war daher eine Aufgabe gemäß der vorliegenden Erfindung, ein Genfallen-Konstrukt bereitzustellen, das eine Isolierung und Identifizierung von Genen, insbesondere transienten Genen, in besonders vorteilhafter Weise ermöglichte. Es war eine weitere Aufgabe gemäß der vorliegenden Erfindung, eine Zelle anzugeben sowie einen Vektor, die dieses Genfallen-Kostrukt enthalten, sowie einen Kit zur Identifizierung und/oder Isolierung von Genen.

Schließlich war es eine Aufgabe gemäß der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren zur Identifizierung und/oder Isolierung von Genen, insbesondere transienten Genen, anzugeben.

Diese Aufgaben werden gelöst durch die Gegenstände der unabhängigen Ansprüche 1, 17 und 22, den Ansprüchen auf eine Zelle 19, einen Vektor, 24, einen Kit, 25, und den Verfahrensanspruch 26.

Bevorzugte Ausführungsformen gemäß der vorliegenden Erfindung sind in den Unteransprüchen angegeben.

Ein "Reportergen" bedeutet hierin eine Nukleinsäuresequenz, die bei Transkription ein nachweisbares Signal, wie beispielsweise ein Proteinprodukt, erzeugt. Das "erste" Reportergen wird durch zelluläre Transkriptionssignale reguliert, in deren Nachbarschaft es integriert wird. Ist das erste Reportergen einmal aktiviert, führt das erste Reportergenprodukt zur Aktivierung des "zweiten" Reportergens, wobei diese zweite Aktivierung dauerhaft, d.h. unabhängig von der Transkriptionsaktivität der das erste Reportergen kontrollierenden DNA-Region ist. Das zweite Reportergen kodiert für ein nachweisbares Genprodukt, wie beispielsweise ein Enzym, das durch eine Farbreaktion nachweisbar ist, oder einen Wachstumsfaktor, auf den hin selektioniert werden kann. Die Kombination aus erstem und zweitem Reportergen führt dazu, daß auch ein nur transient exprimierter Promotor mittels eines dauerhaften Signals (dem zweiten Reportergenprodukt) nachgewiesen werden kann. Das erste Reportergen und das zweite Reportergen können in einem gemeinsamen Konstrukt vorliegen oder sie können auf verschiedenen Konstrukten, die an verschiedenen Orten in der Zelle vorliegen können, vorhanden sein. Das erfindungsgemäße Genfallenkonstrukt ist somit vom Prinzip her eine Kombination aus einem herkömmlichen Genfallen-Konstrukt, wie beispielsweise in US 5364783 beschrieben, das dem ersten Reportergenkonstrukt entspricht, und einem weiteren Konstrukt, das ein dauerhaftes Signal unabhängig von der Promotoraktivität erzeugen kann, im vorliegenden Fall das zweite Reportergenkonstrukt.

Gemäß Anspruch 1 der vorliegenden Erfindung wird ein Genfallen-Konstrukt vorgesehen, das ein erstes Reportergen enthält, das nach Aktivierung ein zweites Reportergen aktivieren kann. Vorzugsweise kodiert das erste Reportergen für eine Rekombinase, wobei diese Rekombinase besonders bevorzugt Cre oder Flp ist.

Das zweite Reportergen kann in einer bevorzugten Ausführungsform für einen Proteinfaktor kodieren, in einer weiteren bevorzugten Ausführungsform kodiert das zweite Reportergen für IL-3 und in einer besonders bevorzugten weiteren Ausführungsform für *E. coli* β-Galaktosidase (lacZ).

Vorzugsweise wird das zweite Reportergen dadurch aktiviert, daß die Rekombinase ein vor dem zweiten Reportergen gelegenes DNA-Fragment deletiert und das zweite Reportergen somit unmittelbar stromabwärts von einem Promotor dauerhaft unter dessen Kontrolle plaziert.

Das deletierte DNA-Fragment kann vorzugsweise ein Antibiotika-Resistenzgen sein, wobei das deletierte DNA-Fragment in einer besonders bevorzugten Ausführungsform für Thymidin-Kinase-Neomycin-Phosphotransferase-Fusionsprotein kodiert und in einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform für eine Neomycinphosphotransferase kodiert.

Der Promotor, vor den das zweite Reportergen plaziert wird, ist vorzugsweise der Phosphoglyceratkinase-Promotor.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird das deletierte DNA-Fragment von Targetsequenzen für die Rekombinase flankiert, die z.B. loxP oder frt sein können. Eine Möglichkeit besteht auch darin, daß sich die Targetsequenzen in der U3- und/oder U5-Region befinden.

Das oben beschriebene Genfallen-Konstrukt kann für eine Identifizierung und/oder Isolierung von Genen, insbesondere transienten Genen, verwendet werden. Hierunter fällt besonders die Isolierung und/oder Identifizierung von für den programmierten Zelltod.verantwortlichen Genen, von Zellzyklusgenen, DNA-Reparaturgenen und differenzierungsspezifischen Genen.

Die vorliegende Erfindung sieht außerdem eine Zelle, vorzugsweise eine Säugetierzelle, vor, die ein Genfallen-Konstrukt wie oben beschrieben enthält.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist die Säugetierzelle von IL-3 abhängig, und enthält ein Genfallen-Konstrukt, in dem das erste Reportergen für Cre-Rekombinase kodiert, wobei die Cre-Rekombinase ein vor dem zweiten Reportergen gelegenes DNA-Fragment deletieren kann, wobei das deletierte Fragment für ein Thymidinkinase-Neomycinphosphotransferase-Fusionsprotein kodiert und von loxP-Targetsequenzen flankiert ist und wobei das zweite Reportergen für IL-3 kodiert und nach Deletion des Thymidin-Kinase-Neomycinphosphotransferase-Fusionsproteingens unmittelbar stromabwärts des Phosphoglyceratkinasepromotors zu liegen kommt.

Besonders bevorzugt ist die Säugetierzelle eine wachstumsfaktor-abhängige hämatopoetische Vorläuferzelle (z.B. FDCP1) oder eine totipotente embryonale Stammzelle.

Die Säugetierzelle gemäß der vorliegenden Erfindung kann für eine Identifizierung und/oder Isolierung von Genen, insbesondere transienten Genen, verwendet werden, wobei insbesondere eine Identifizierung und/oder Isolierung von für den programmierten Zelltod verantwortlichen Genen, von Zellzyklusgenen, DNA-Reparaturgenen und differenzierungsspezifischen Genen bevorzugt ist.

Weiterhin sieht die vorliegende Erfindung einen Vektor vor, der das Genfallen-Konstrukt wie oben beschrieben enthält. Ferner wird ein Kit zur Identifizierung und/oder Isolierung von Genen vorgestellt, insbesondere transienten Genen, der mindestens ein Genfallen-Konstrukt wie oben beschrieben enthält.

Vorzugsweise enthält der Kit zwei Konstrukte, wobei das erste Konstrukt das erste Reportergen und das zweite Konstrukt das zweite Reportergen enthält.

Der Kit kann auch einen Vektor wie oben beschrieben enthalten.

Schließlich sieht die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Identifizierung und/oder Isolierung von Genen, insbesondere transienten Genen vor, das die folgenden Schritte enthält:

- Einbau eines Genfallen-Konstrukts wie oben beschrieben in eine geeignete Zelle;
- Selektion auf Zellen, bei denen das erste Reportergen in ein Gen, vorzugsweise nicht aktives Gen, eingebaut ist;
- Aktivierung des ersten Reportergens, vorzugsweise durch Initiation der Transkription des nicht aktiven Gens, woraufhin das zweite Reportergen aktiviert wird; und
- Identifizierung und/oder Isolierung des Gens, in das das erste Reportergen eingebaut ist.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist das oben beschriebene Verfahren dadurch gekennzeichnet, daß

 ein Genfallen-Konstrukt, wie oben beschrieben, als erstes Reportergen das Cre-Rekombinase-Gen enthält, daß die Cre-Rekombinase ein stromaufwärts vom zweiten Reportergen gelegenes Thymidinkinase-Neomycinphosphotransferase-Gen deletiert, wodurch das zweite Reportergen, das für IL-3 kodiert, neben einem Phosphoglyceratkinase-Promotor zu liegen kommt,

- das Genfallen-Konstrukt in eine IL-3-abhängige FDCP-1-Zelle eingeschleust wird,
- durch Zucht in Neomycin-(z.B. G 418-)haltigem Medium auf Zellen selektiert wird, die Cre-Rekombinase nicht produzieren,
- diese selektierten Zellen in IL-3-freiem Medium gezüchtet werden, so daß für den programmierten Zelltod verantwortliche Gene aktiviert werden,
- daß die überlebenden Zellen selektioniert werden und
- die für den programmierten Zelltod verantwortlichen Gene mit den bekannten Verfahren isoliert werden.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist das Verfahren dadurch gekennzeichnet, daß

- ein Genfallen-Konstrukt, wie oben beschrieben, als erstes Reportergen das Cre-Rekombinase-Gen enthält, daß die Cre-Rekombinase ein stromaufwärts vom zweiten Reportergen gelegenes Neomycinphosphotransferase-Gen deletiert, wodurch das zweite Reportergen, das für lacZ kodiert, neben einem Phosphoglyceratkinase-Promotor zu liegen kommt,
- das Genfallen-Konstrukt in eine totipotente embryonale Stammzelle eingeschleust wird,
- durch Anzucht auf G418 auf Zellen selektiert wird, die Cre-Rekombinase nicht produzieren,
- diese selektiven Zellen zum Differenzieren induziert werden, so daß differenzierungsspezifische Gene aktiviert werden.
- diese Zellen isoliert werden.

- diese Zellen in die Keimbahn eines Säugetiers eingeführt werden und dort für die Bildung von Geweben verantwortlich sind und
- die differenzierzungsspezifischen Gene mit den bekannten Verfahren isoliert werden.

Das oben genannte Verfahren zur Isolierung von für den programmierten Zelltod verantwortlichen Genen ist deshalb besonders geeignet, weil durch permanenten Selektionsmarkeraustausch durch eine Genfalle, die Cre-Rekombinase exprimiert, im wesentlichen sterbende Zellen durch Aktivierung der endogenen Cytokinproduktion in sich vermehrende Zellen umgewandelt werden. Dies erlaubt eine Selektion für die Integration in Gene, die während des programmierten Zelltods aktiv sind. Die Expression des Selektionsmarkers, z.B. IL-3, wird entkoppelt von der Expression des lokalisierten Gens (in der Genfalle), indem die Rekombinase den Selektionsmarker hinter den Phosphoglyceratkinasepromotor bringt. Dies ist besonders wichtig, da es unwahrscheinlich ist, daß Zellen die für den Zelltod verantwortlichen Gene ständig exprimieren. Schließlich ist das Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung nicht auf hochexprimierte Gene beschränkt, und die Genrepräsentation ist sehr viel gleichmäßiger als z.B. bei der cDNA-Klonierung. Weiterhin ist die Verwendung von Genfallen zur Isolierung und/oder Identifizierung, anders als die differentielle RT-PCR-Amplifikation, gut reproduzierbar, vermeidet eine Redundanz und ermöglicht sogar eine Quantifizierung. Schließlich sind die Genfallen-Proviren ständig in oder nahe der 5'-Exons lokalisiert und haben dieselbe transkriptionelle Orientierung in bezug auf das Gen, was das Klonieren deutlich erleichtert.

Auf jeden Fall ermöglicht die Charakterisierung der zellulären Transkripte, die durch den IL-3-Entzug induziert werden, tiefere Einblicke in die komplexen molekularen Veränderungen, die während des programmierten Zelltods stattfinden.

Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform enthält eine totipotente Zelle, die von sich aus einen gesamten Organismus bilden kann, ein Konstrukt, bei dem

das erste Reportergen eine Cre-Rekombinase kodiert, die ein vor dem zweiten Reportergen gelegenes Fragment deletieren kann, wobei das deletierte Fragment für neo kodiert und von loxP-Targetsequenzen flankiert ist, und das zweite Reportergen kodiert für lacZ, das nach Deletion von neo unmittelbar stromabwärts von pgk zu liegen kommt.

Die beigefügten Figuren sollen die vorliegende Erfindung verdeutlichen:

<u>Figur 1</u> zeigt das Verfahren gemäß der Erfindung in einer schematischen Darstellung zweier bevorzugter Ausführungsformen.

- (A) Aktivierungsmechanismus der endogenen IL-3 Sekretion in FLOXIL-3-Zellen nach IL-3-Entzug. Eine U3-Cre-Genfallenintegration in ein ursprünglich nicht exprimiertes Apoptosegen wird transient durch IL-3-Entzug aktiviert (Ii.). Durch ortsspezifische Rekombination des Reporterplasmids ppgklxtkneolL3 wird das tkneo-Gen eliminiert und das IL3-Gen wird unmittelbar stromabwärts des pgk-Promotors plaziert. Dadurch kommt es zu einer anhaltenden IL-3 Synthese, die auch nach Abschaltung des in der Genfalle gefangenen Gens anhält.
- (B) Aktivierungsmechanismus des LacZ-Gens während der Differenzierung von totipotenten embryonalen Stammzellen -pln13-. Eine U3-Cre-Genfallenintegration in ein ursprünglich nicht exprimiertes Differenzierungsgen wird transient während der Differenzierung aktiviert. Durch ortsspezifische Rekombination des Reporterplasmids ppgklxneoLacZ wird das LacZ-Gen unmittelbar stromabwärts des pgk-Promotors plaziert. Dadurch kommt es zu einer anhaltenden Synthese von ß-Galaktosidase, die auch nach Abschaltung des in der Genfalle gefangenen Gens anhält.

<u>Figur 2</u> zeigt eine schematische Übersicht über ein Verfahren zur Isolierung und Analysierung von induzierbaren Differenzierungsgenen aus embryonalen Stammzellen.

<u>Figur 3</u> zeigt die Cre/loxP-vermittelte Rekombination des ppgklxtkneolL3-Plasmids in FLOXIL-3-Zellen mit U3-Cre-Genfallenintegrationen in exprimierten Genen.

- (A) Struktur von ppgklxtkneolL3 vor und nach Rekombination.
- (B) Southern-Blot-Analyse von autonomen und parentalen FLOXIL-3-Zellen. Genomische DNAs wurden mit BamHI geschnitten, in Agarosegelen fraktioniert und auf Nylon-Membranen transferiert. Die Hybridisierung erfolgte mit <sup>32</sup>P-markierten neo-(li.) oder pgk-spezifischen Sonden. Bahn 1:parentale FLOXIL-3-Zellen; Bahnen 2-6: autonome Klone 1-5. Molekulargewichte wurden anhand einer 1 kb-BRL-Leiter bestimmt.

<u>Figur 4</u> zeigt U3-Cre-Genfallenintegrationen und ortspezifische Rekombination in autonomen, nach IL-3-Entzug isolierten Klonen.

(Oben) Erwartete Struktur der U3-Cre-Proviren (li.) und der rekombinierten Reporterplasmide (re.).

(Unten) Southern-Blot-Analyse von Klonen, die nach IL-3-Entzug aus der U3-Cre/FLOXIL-3-Integrationsbank isoliert wurden. Die genomische DNA der einzelnen Klone wurde mit BamHI geschnitten und wie in der Legende zu Figur 3 behandelt. Die Hybridisierung erfolgte mit <sup>32</sup>P-markierten Cre- (links) oder pgk- (rechts) spezifischen Sonden. Bahn 1,26-11-1; Bahn 2,26-11-3; Bahn 3,26-11-4; Bahn 4,26-11-5; Bahn 5,26-11-6, Bahn 6,26-11-7; Bahn 7,26-11-8; Bahn 8,26-12-1; Bahn 9,26-12-2; Bahn 10,26-12-3; Bahn 11,26-12-4; Bahn 12,26-12-5. Die abgebildeten Proben sind für die gesamte Integrationsbank repräsentativ.

<u>Figur 5</u> zeigt eine Untersuchung der Zell-Provirus-Fusionstranskripte. **(Oben)** Von U3-Cre-Genfallenintegrationen in exprimierte Gene erwartete Transkripte.

(Unten) Northern-Blot-Analyse von Zell-Provirus-Fusionstranskripten vor und nach Serumentzug. Polyadenylierte RNA (5 μg) wurde in Formaldehyd-Agarose-Gelen fraktioniert und auf Nylonmembranen transferiert. Die Hybridisierung erfolgte mit <sup>32</sup>P-markierten Cre- oder GAPDH-spezifischen Sonden. Ungerade Zahlen repräsentieren RNAs vor, gerade Zahlen RNAs nach 16-stündigem

Serumentzug. Bahnen 5 und 6 enthalten RNA von einem Klon mit einer konstitutiv exprimierten U3-Cre-Integration.

Figur 6 zeigt eine Untersuchung von zellulären, nach IL-3-Entzug induzierten Transkripten. Polyadenylierte RNA (5 μg/Bahn) wurde von FDCP1-Zellen gewonnen, denen IL-3 für 0,6, und 12 Stunden entzogen wurde. Northern-Blots wurden wie in der Legende zu Figur 5 hergestellt und mit <sup>32</sup>P-markierten-5'-Provirus-flankierenden Sequenzen oder GAPDH hybridisiert.

Figur 7 zeigt die differenzierungsregulierte U3-Cre-Genfallenintegrationen in embryonale Stammzellen. 960 Pools zu je 150 Zellen wurden mit dem U3-Cre-Virus infiziert und in G418 selektiert. Differenzierungsinduktion erfolgte über 4 Tage.

(Links) X-Gal Färbung vor (Ii.) und nach (re.) Differenzierungsinduktion.

(Rechts) Southern-Blot-Analyse der regulierten Klone. Die genomische DNA wurde mit BamHl geschnitten und wie in der Legende zu Figur 3 behandelt. Die Hybridisierung erfolgte mit <sup>32</sup>P-markierten Cre- (links) oder pgk- (rechts) spezifischen Sonden. u = undifferenziert; d = differenziert.

Einzelheiten dazu sind den Beispielen zu entnehmen.

Im folgenden soll die Erfindung anhand von Beispielen im einzelnen beschrieben werden, wobei die Beispiele jedoch den Umfang der Erfindung nicht limitieren sollen.

#### BEISPIELE

#### Beispiel 1

# Herstellung eines Reporterplasmids

Die meisten Bestandteile des Reporterplasmids ppgklxtkneolL-3 (Phosphoglyceratkinasepromotor, loxP-Targetsequenz, Thymidinkinase-Neomycinphosphotransferase-Fusionsprotein, IL-3-Gen) wurden in p-BluescriptII-KS wie folgt zusammengestellt:

Die Sequenzen für die Targetsequenz loxP wurden aus pGEM30 entnommen. Ein loxP-Ort wurde zunächst in den Bluescript Polylinker als ein EcoRI/PstI-Fragment inseriert. Anschließend wurde pgk (Phosphoglyceratkinasepromotor, erhalten von ppgkCAT) in die Xbal/BamHl-Rekombinationsstelle des Polylinkers ligiert und das Thymidinkinase-Neomycinphosphotransferase-Fusionsgen wurde in die stromabwärts gelegene EcoRV-Rekombinationsstelle kloniert. Das IL-3-Gen (als cDNA von Mäusen, aus pc-Multi-CSF) wurde zunächst in die EcoRI-Stelle des Polylinkers von pGEM30 subkloniert, der die loxP-Targetsequenzen flankierte, nachdem zunächst das Plasmid mit Clal/Sall gespalten wurde und die aufgefüllten Enden wieder ligiert wurden, um eine zusätzliche EcoRI-Stelle zu entfernen. IL-3-loxP wurde dann aus pGEM30 als ein Sall/Xhol-Fragment gewonnen und in den Bluescript Polylinker kloniert. Eine Kopie der Rinderwachstumshormon-Polyadenylierungssequenz (bpa) als Xbal/Aval-Fragment wurde mit glatten Enden in die Clal-Stelle stromabwärts von tkneo kloniert. Um ppgklxtkneo-IL-3 zu erhalten, wurde ein Xhol-Fragment, das die gesammelten Sequenzen enthielt, in pSBC2, stromaufwärts einer SV-40-Polyadenylierungsstelle kloniert. Da dieses anfängliche Konstrukt noch eine Translation von IL-3 von dem dicistronischen tkneo-IL-3-Transkript ermöglichte, wurde eine zweite Kopie von bpa mit glatten Enden in die Sall-Stelle von pSBCII kloniert, um das endgültige ppgklxtkneo-IL-3-Reporterplasmid zu erhalten.

#### Beispiel 2

Konstruktion einer FDCP1-Reporterzellinie, die zwei selektierbare Reportergene exprimiert, die flankiert sind von loxP-Rekombinationstargets

Die verwendeten FDCP1 hämatopoetischen Vorläuferzellen sind strikt abhängig von IL-3 für ihr Wachstum und initiieren den programmierten Zelltod, wenn dieser Wachstumsfaktor dem Medium entzogen wird.

Die FDCP1-Zellen wurden bei Konzentrationen von 2 x 10<sup>5</sup> Zellen pro ml in Dulbeccos modifizierten Eagles-Medium (DMEM; Gibco), ergänzt mit 10 % v/v fötalem Rinderserum (High Clone Laboratories, Utah, USA) und 10 ng/ml rekombinanten Mäuse-IL-3 (Sandoz) gezüchtet. Die Agarkulturen waren eine Mischung von gleichen Volumen von doppelstarkem DMEM, ergänzt mit 40 %igem (v/v) fötalem Rinderserum (Hyclone) und 0,6 % (w/v) Bactoagar (Difco) in doppelt destilliertem Wasser. Etwaige Kulturen enthielten 5 μM Gancichlovir (Syntex).

Um eine Zellinie zu erhalten, die sich durch Cre-Rekombinase in eine faktorunabhängige Zelle umwandeln läßt, wurden FDCP1-Zellen mit dem Reporterplasmid ppgklxtkneo-IL-3 elektroporiert. Die Elektroporation wurde unter Verwendung eines BioRad Gene Pulser (BioRad) nach den Instruktionen des Herstellers durchgeführt. Die Rekombinanten wurden in Agarkulturen isoliert, die 0,6 mg/ml G418 enthielten. Die sich entwickelnden Klone wurden nach 10 Tagen isoliert und in Suspensionskulturen wie oben beschrieben expandiert. Das ppgklxtkneo-IL-3 (Figur 3A) besteht aus zwei hintereinander angeordneten selektierbaren Reportergenen, die von einem pgk(Phosphoglyceratkinase)-Promotor transkribiert werden. Das Gen am 5'-Ende kodiert für ein HSV2-Thymidinkinase(Tk)-Neomycinphosphotransferase(neo)-Fusionsprotein und wird von zwei loxP-Rekombinationstargets flankiert. Das 3'-Ende des Gens kodiert für IL-3 aus Mäusen und endet in einer SV40-Polyadenylierungssequenz. Um die IL-3-Translation von dicistronischen Transkripten zu unterdrücken, wurden zwei hintereinander gelegene Kopien der Polyadenylierungssequenz des Rinderwachstumshormons (bpa) stromabwärts von tkneo inseriert. Auf diese Weise konnte man annehmen, daß auch Zellen, die ppgklxtkneo-IL-3 exprimierten, immer noch IL-3-abhängig waren. Da die Cre-Rekombinase typischerweise diejenigen Sequenzen ausschneidet, die von direkten loxP-Wiederholungen flankiert werden, wurde angenommen, daß die Cre-Expression das tkneo-Gen deletiert und dadurch das IL-3-Gen genau stromabwärts des pgk-Promotors plaziert. Als Ergebnis würden die Zellen ihre Neomycinresistenz verlieren und eine Faktorunabhängigkeit durch Synthese von IL-3 erwerben.

Stabile FDCP1-Transformanten wurden in G418 selektiert und fünf klonale Zellinien wurden aus den Agarkulturen isoliert. Eine Zellinie, die ein Einzelkopieplasmid exprimierte, und im weiteren als FLOXIL-3 bezeichnet werden wird, wurde zur weiteren Analyse selektiert.

Zunächst wurde festgestellt, ob die FLOXIL-3-Zellen immer noch für ihr Wachstum von IL-3 abhängig waren, indem 5 x 10<sup>7</sup> Zellen in einer Dichte von 2 x 10<sup>5</sup> pro ml in halbfeste (Agar-) Kulturen ohne IL-3 plattiert wurden. Da sich innerhalb von 10 Tagen keine Kolonien entwickelten, wurde angenommen, daß weder eine geringe IL-3-Translation noch spontane Rekombination innerhalb dieser Zellen aufgetreten war.

Um dies weiterhin sicherzustellen, wurden FLOXIL-3 und Eltern-FDCP1-Zellen in Agarkulturen ohne IL-3 für bis zu 24 Stunden vorinkubiert und anschließend durch Gabe von IL-3 gerettet. Beide Zelltypen initiierten den programmierten Zelltod mit ähnlichen Kinetiken, was andeutet, daß die Expression von ppgklxtkneo-IL-3 die zelluläre Antwort auf den Faktorentzug nicht veränderte. Außerdem überlebten die meisten Zellen für mehr als 12 Stunden ohne IL-3 und ließen so genügend Zeit für die Expression der Genfallen-transduzierten Sequenzen.

#### Beispiel 3

Herstellung einer Genfalle, die Cre-Rekombinase (U3-Cre) exprimiert und FLOXIL-3-Zellen faktorunabhängig macht

Ein U3-Cre-Genfallen-Vektor wurde aus dem auf MoMuLV basierenden pGgU3Neo(en-)Vektor abgeleitet, indem das neo-Gen in der U3-Region mit der für Cre kodierenden Sequenz, die aus pMCCre abgeleitet wurde, ersetzt wurde. Das Plasmid wurde in Helferzellen transfiziert und die Überstände der Zellinien, die hohe Titer von rekombinanten Viren produzierten, wurden verwendet, um FLOXIL-3-Zellen zu infizieren. Wie schon früher gezeigt, plaziert die Virusreplikation und LTR-vermittelte Duplikation die Sequenzen, die in U3 inseriert sind, genau 30 Nukleotide stromabwärts von der flankierenden zellulären DNA. Dies

ermöglicht deren Expression aus Integrationen in transkribierte Gene. Es wurde daher erwartet, daß sich FLOXIL-3-Zellen mit U3-Cre-Integrationen in exprimierten Genen in faktorunabhängige Zellen umwandeln würden. Um auf dieses Ereignis zu selektieren, wurden virusinfizierte FLOXIL-3-Zellen in Agarkulturen ohne IL-3 plattiert. Es wurden mehrere autonom wachsende Kolonien erhalten und in Suspensionskulturen expandiert. Wie von der Expression eines rekombinierten Reporterplasmids zu erwarten war, verloren alle Klone ihre G418-Resistenz und wuchsen ohne IL-3.

Um die Rekombination zu bestätigen, wurden genomische DNAs von fünf autonomen Klonen mit BamHI verdaut und durch Southern Blotting analysiert. Da BamHI innerhalb der 5'-Enden von pgk und IL-3 spaltet, erzeugen nicht rekombinierte FLOXIL-3-Zellen ein internes Fragment von 3,2 kb, das sowohl mit pgk- als auch neo-spezifischen Sonden hybridisiert (Figur 3A). Da dieses Fragment alle Sequenzen enthält, die von loxP flankiert sind, inklusive tkneo, sollte seine Deletion mit einer Reduktion in der Größe von 2,6 kb verbunden sein. Tatsächlich produzierten alle Klone ein 0,6 kb-Restriktionsfragment, das nicht mit neo hybridisierte, was andeutete, daß eine Rekombination stattgefunden hatte (Figur 3B).

Außerdem exprimierten alle Klone Zell-Provirus-Fusionstranskripte, wenn sie durch Northern Blotting analysiert wurden, was andeutete, daß die Cre-Rekombinase von aktiven zellulären Promotoren exprimiert wurde.

Auf diese Weise werden FLOXIL-3-Zellen erhalten, die ein Genfallen-Konstrukt enthalten, das es ermöglicht, diejenigen Gene zu isolieren und identifizieren, die für den programmierten Zelltod verantwortlich sind.

### Beispiel 4

Herstellung einer U3-Cre/FLOXIL-3-Integrationsbank und Isolierung von transient exprimierten Gensequenzen

Eine Integrationsbank, bestehend aus  $2 \times 10^6$  unabhängigen proviralen Integrationen, wurde durch Infektion von FLOXIL-3-Zellen mit U3-Cre-Retroviren herge-

stellt. Die infizierten Zellen wurden zunächst in G418 vorselektiert, um sämtliche Integrationen in exprimierte Gene zu eliminieren. Figur 4 zeigt, daß dieses Ziel nach 16-tägiger Selektion erreicht wurde. Nach Ausplattierung einer simplen Repräsentation der Integrationsbank in Agarkulturen ohne IL-3 konnten insgesamt 110 autonome Klone isoliert und expandiert werden. Southern-Blot-Untersuchungen haben gezeigt, daß sämtliche Klone eine Provirusintegration aufwiesen und durchweg rekombinierte Reporterplasmide enthielten (Figur 4).

Northern-Blot-Untersuchungen mit mRNA von 11 unabhängigen autonomen Klonen zeigen, daß in 9 Klonen Zell-Provirus-Fusionstranskripte entweder nur sehr schwach oder gar nicht exprimiert waren (Figur 5, Bahnen 1,3,7,9,11,13,17,19, 21). Dies besagt, daß die Cre-Rekombinase nur transient stark genug exprimiert war, um eine Rekombination des Reporterplasmids zu verursachen. Ferner waren über 50% dieser Fusionstrankripte durch Serumentzug induzierbar, was andeutet, daß die von der Genfalle unterbrochenen Gene mit einem apoptotischen Programm- oder Wachstumsarrest verbunden sind (Figur 5)...

Schließlich wurden die nach bekannten Verfahren klonierten 5'-Provirus-flankierenden Sequenzen (von Melchner et al., 1992) mit der mRNA von Wildtyp FDCP1-Zellen auf Northern Blots hybridisiert. Die Mehrzahl der untersuchten Proben hybridisierte mit IL-3-induzierten, zellulären Transkripten (Figur 6). Ob diese Gene die Selbstmordmaschinerie direkt kontrollieren oder Teil anderer Mechanismen sind, die in Folge des programmierten Zelltods aktiviert werden, muß noch festgestellt werden. Auf jeden Fall erlaubt die Charakterisierung der zellulären Transkripte, die durch den IL-3-Entzug induziert werden, weitere Einblicke in die komplexen molekularen Veränderungen, die während des programmierten Zelltods auftreten.

Die weitere genaue Identifizierung und Isolierung der entdeckten Gene kann mit den bekannten Verfahren durchgeführt werden, so z.B. 3'RACE oder der Erstellung einer Genbibliothek und Klonierung und Sequenzierung der entdeckten Gene.

## Beispiel 5

#### Konstruktion einer ES-Reporterzellinie

Um eine ES-Zellinie zu erhalten, die einem permanenten selektierbaren Reporterwechsel durch Cre-Rekombinase zugänglich war, wurden D3-Zellen mit dem Reporterkonstrukt ppgklxneolacZ elektroporiert, in dem zwei hintereinander angeordnete Reportergene von einem Maus-Phosphoglyceratkinase(pgk)-Promotor transkribiert werden. Das Reporterkonstrukt ppgklxneolacZ besteht aus dem Phosphoglyceratkinasepromotor, den loxP-Targetsequenzen, dem Neomycinphosphotransferase-Gen und einem Gen für lacZ. Seine Herstellung erfolgt analog der oben beschriebenen Herstellung des Reporterplasmids ppgklxtkneo-IL-3.

Das 5'-Gen kodiert für Neomycinphosphotransferase und wird von zwei loxP-Rekombinationstargets in identischer Orientierung flankiert. Das 3'-Gen kodiert für β-Galaktosidase und endet in einer SV40-Polyadenylierungssequenz. Um genomische Transkripte zu unterdrücken, die in SV40-PolyA enden und auf diese Weise auch die Translation von lacZ zu unterdrücken, wurden zwei hintereinanderliegende Kopien von Rinderwachstumshormon-Polyadenylierungssequenz (bpa) stromabwärts der Neomycinphosphotransferase inseriert. Dementsprechend sollten ppgklxneolacZ-exprimierende Zellen einen Neomycinphosphotransferase-resistenten und lacZ-negativen Phänotyp aufweisen. Im Falle einer CreExpression würde die Rekombinase jedoch das neo-Gen ausschneiden und die lacZ-kodierende Sequenz unmittelbar stromabwärts vom pgk-Promotor plazieren. Im Ergebnis verlieren die Zellen, die rekombinierte Reporterplasmide exprimieren, ihre Neomycinresistenz und färben sich positiv mit X-Gal (lacZ<sup>+</sup>).

Verschiedene ppgklxneolacZ-exprimierende ES-Zellinien wurden in G418 isoliert und individuell auf Hintergrund-X-Gal-Färbung getestet. 4 von 10 Zellinien färbten sich regelmäßig nicht mit X-Gal, sogar nach langen Kulturperioden. Wenn man diese Zellinien dazu induzierte, in Kulturen zu differenzieren, die kein LIF (Leukemie Inhibitory Factor) oder Nährschichten enthielten, färbten sich lacZ-Zellen weiterhin negativ, was andeutete, daß der lacZ-Phänotyp stabil ist. Eine

Zellinie, die eine einzelne Kopie von ppgklxneolacZ exprimierte, wurde für eine weitere Analyse selektiert. Sie wird im weiteren als pln13 bezeichnet.

Um festzustellen, ob die Cre-Rekombinase den lacZ-Phänotyp von pln13 in lacZ<sup>+</sup> umwandelt, wurden die Zellen mit Cre-exprimierendem Plasmid pMC-Cre transfiziert. Nicht selektierte Kolonien wurden nach 10 Tagen gepickt und Aliquots wurden mit X-Gal gefärbt. Genomische DNA, die aus verschiedenen lacZ<sup>+</sup>-Zellen extrahiert wurde, wurde mit BamHI gespalten und durch Southern Blotting analysiert. In jedem Fall war der lacZ-Phänotyp mit einer 2 kb-Deletion assoziiert, was andeutete, daß das Reporterplasmid einer ortsspezifischen Rekombination unterworfen war.

#### Beispiel 6

Expression von β-Galaktosidase in pln13-Zellen durch U3-Cre-Integration

5 x 10<sup>4</sup> pln13-Zellen wurden mit U3-Cre-Virus, hergestellt wie oben beschrieben, bei einer MOI = 1 infiziert. Nach einer Inkubation von 72 Stunden wurden die Zellen in 480 Pools geteilt und in Mikrotiterplatten ausgesät. Nach 48 Stunden wurden Aliquots mit X-Gal gefärbt, um Integrationen in aktive Gene zu identifizieren. Von 20 Pools, die lacZ<sup>+</sup>-Zellen enthielten, wurden 3 in klonaler Dichte ausgesät. 4 positive Klone wurden durch Selektion isoliert und durch Southern-Blotting analysiert. Alle Klone enthielten 1 bis 2 Proviren, die mit einem MOI = 1 übereinstimmten und enthielten rekombinierte Reporterplasmide. Jeder Klon exprimierte außerdem Zell-Provirus-Fusionstranskripte, deren Größe erwartungsgemäß um 100 bis 500 nt variierte.

Auf diese Weise vermitteln U3-Cre-Genfallen-Retroviren effektiv ortsspezifische Rekombinationen aufgrund ihrer Integration in exprimierte Gene.

## Beispiel 7

Isolierung von Klonen mit induzierbarer U3-Cre-Provirusintegration

Um festzustellen, ob die U3-Cre/loxP-Strategie geeignet ist, um Gene zu isolieren, die durch Differenzierung induzierbar sind, wurden 1,5 x 10<sup>5</sup> pln13-Zellen in die Vertiefungen von 10 Mikrotiterplatten bei Konzentrationen von 150 Zellen pro Vertiefung ausgesät und mit U3-Cre-Virus bei ungefähr MOI = 1 infiziert. Um Integrationen in aktive Gene zu eliminieren, wurden Zellen auf G418 für 5 Tage selektiert. Anschließend wurden Aliquots jeder Vertiefung in Abwesenheit von sowohl LIF (Leukemia Inhibitory Factor) oder MEF (Mouse Embryonic Fibroblasts) zum Differenzieren induziert und mit X-Gal gefärbt. 44 von 960 Vertiefungen färbten sich bei diesem Test positiv. Nach einem weiteren Test waren 9 Pools lacZ<sup>+</sup> sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von LIF und MEF, während 35 Pools zu lacZ<sup>+</sup> nur infolge von Differenzierungen wechselten, was andeutete, daß U3-Cre-Integrationen in den induzierten Genen aufgetreten waren.

Figur 7 zeigt beispielhaft drei isolierte Klone mit U3-Cre-Provirusintegrationen in differenzierungsspezifische Gene. Die Induzierbarkeit der Gene wird durch den phänotypischen Wechsel von LacZ(-) (Figur 7A, undifferenzierte Zellen, oben li.) zu LacZ(+) (Figur 7A, differenzierte Zellen, oben re.) belegt. Die Southern-Blots beweisen, daß diesem Wechsel die ortspezifische Rekombination des Reporterplasmids zugrunde liegt, die von U3-Cre-Provirusintegrationen in induzierbare Differenzierungsgene verursacht wurde (Figur 7B).

In Figur 2 ist eine Übersicht über eine derartige Isolierung gezeigt. Im ersten Schritt wird mit U3-Cre-Genfallen-Vektor infiziert und auf G418 selektiert. Die erhaltenen Kolonien werden in Aliquots unterteilt, zum Differenzieren induziert und mit X-Gal gefärbt. Nur die gefärbten Klone werden weiter selektiert, expandiert und zur Konstruktion von chimären Mäusen verwendet. Diese Mäuse können wiederum verwendet werden, um die IacZ-Verteilung im Gewebe zu bestimmen oder den Phänotyp von homozyoten F2-Mäusen zu bestimmen und -/-ES-Zellen zu isolieren.

Die entsprechenden zellulären Gene können von den bekannten Genfallensequenzen durch bekannte Verfahren kloniert werden.

Auf diese Weise ermöglicht das Genfallen-Konstrukt gemäß der vorliegenden Erfindung, Gene, insbesondere nur transient exprimierte Gene, zu isolieren und/oder zu identifizieren.

#### Literaturliste

Coffin, J. M., Stoye, J. P., and Frankel, W. N. (1989). Genetics of endogenous murine leukemia viruses. Ann. N Y Acad. Sci. 567, 39-49.

Goff, S. P. (1990). Integration of retroviral DNA into the genome of the infected cell. Cancer Cells, 172-178.

Gridley, T., Soriano, O., and Jaenisch, R. (1987). Insertional mutagenesis in mice. Trends Genet. 3, 162-166.

Hill, D. H. P., and Wurst, W. (1993). Mutagenic strategies to dissect mammalian development. Curr. Topics. Dev. Biol. 28, 181-206.

Hill, D. H. P., and Wurst, W. (1993). Screening for pattern formation in mouse using gene trap technology. Methods Enzym. 255, 663-681.

Muthuchamy, M., Pajak, L., Howles, P., Doetschman, T., and Wieczorek, D. (1993). Developmental analysis of tropomyosin gene expression in embryonic stem cells and mouse embryos. Mol. Cell. Biol. 13, 3311-3323.

Rappolee, D. A., Brenner, C. A., Schultz, R., Mark, D., and Werb, Z. (1988). Developmental expression of PDGF, TGF-a and TGF-b in preimplantation mouse embryos. Science 241, 1823-1825.

Reddy, S., Rayburn, H., von Melchner, H., and Ruley, H. E. (1992). Fluorescence activated sorting of totipotent embryonic stem cells expressing developmentally regulated lacZ fusion genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 6721-6725.

Rogers, M. B., Hosler, B. A., and Gudas, L. J. (1991). Specific expression of a retinoid acid-regulated, zinc-finger gene, Rex-1, in preimplanation embryos, trophoblast and spermatocytes. Development 113, 815-824.

Sandmeyer, S. B., Hansen, L. J., and Chalker, D. L. (1990). Integration specificity of retrotransposons and retroviruses. Ann. Rev. Genet. 24, 491-518.

Scholer, H. R., Dressler, G. R., Balling, R., Rohdewohld, H., and Gruss, P. (1990). Oct-4: a germline-specific transcription factor mapping to the mouse t-complex. EMBO J 9, 2185-2195.

Sharpe, N. G., Williams, D. G., and Latchman, D. S. (1990). Regulated expression of the small nuclear ribonucleoprotein particle protein SmN in embryonic stem cell differentiation. Mol. Cell. Biol. 10, 6817-6820.

Skarnes, W. C., Auerbach, B. A., and Joyner, A. L. (1992). A gene trap approach in mouse embryonic stem cells: the lacZ reporter is activated by splicing, reflects endogenous gene expression, and is mutagenic in mice. Genes Dev. 6, 903-918.

Varmus, H. (1988). Retroviruses. Science 240, 1427-1435.

von Melchner, H., DeGregori, J. V., Rayburn, H., Reddy, S., Friedel, C., and Ruley, H. E. (1992). Selective disruption of genes expressed in totipotent embryonal stem cells. Genes Dev 6, 919-927.

von Melchner, H., and Ruley, H. E. (1995). Functional analysis of the mammalian genome by gene entrapment. In Functional Analysis of the Human Genome, F. Farzane and D. N. Cooper, eds. (Oxford: Bios Scientific Publishers). 109-124.

Withers-Ward, E. S., Kitamura, Y., Barnes, J. P., and Coffin, J. M. (1994). Distribution of targets for avian retrovirus DNA integration in vivo. Genes Dev. 8, 1473-1487.

Jaenisch, R., Breindl, M., Harbers, K., Jahner, D., and Lohler, J. (1985). Retroviruses and insertional mutagenesis. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 50, 439-445.

Friedrich, G., and Soriano, P. (1991). Promoter traps in embryonic stem cells: a genetic screen to identify and mutate developmental genes in mice. Genes Dev. 5, 1513-1523.

DeGregori, J., Russ, A., von Melchner, H., Rayburn, H., Priyaranjan, P., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., and Ruley, H. E. (1994). A murine homolog of the yeast RNA1 gene is required for postimplantation development. Genes Dev. 8, 265-276.

## <u>Patentansprüche</u>

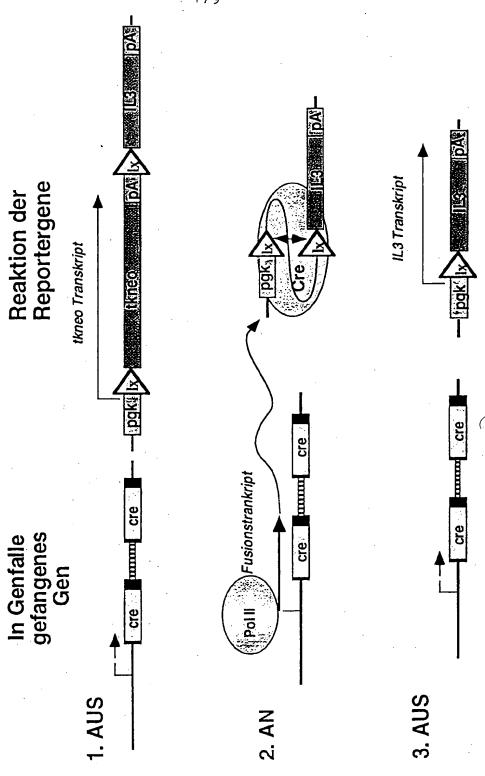
- 1. Genfallen-Konstrukt, enthaltend ein erstes Reportergen, das nach Aktivierung ein zweites Reportergen aktivieren kann.
- 2. Genfallen-Konstrukt gemäß Anspruch 1, <u>dadurch gekennzeichnet</u>, daß das erste Reportergen für eine Rekombinase kodiert.
- 3. Genfallen-Konstrukt gemäß Anspruch 2, <u>dadurch gekennzeichnet</u>, daß die Rekombinase Cre ist.
- 4. Genfallen-Konstrukt gemäß Anspruch 2, <u>dadurch gekennzeichnet</u>, daß die Rekombinase Flp ist.
- 5. Genfallen-Konstrukt gemäß einem oder mehreren der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das zweite Reportergen einen Proteinfaktor kodiert.
- 6. Genfallen-Konstrukt gemäß Anspruch 5, <u>dadurch gekennzeichnet,</u> daß das zweite Reportergen für IL-3 kodiert.
- 7. Genfallen-Konstrukt gemäß Anspruch 5, <u>dadurch gekennzeichnet</u>, daß das zweite Reportergen für lacZ kodiert.
- 8. Genfallen-Konstrukt gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 2 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß das zweite Reportergen dadurch aktiviert wird, daß die Rekombinase ein vor dem zweiten Reportergen gelegenes DNA-Fragment deletiert und das zweite Reportergen somit stromabwärts von einem Promotor unter dessen Kontrolle plaziert.
- 9. Genfallen-Konstrukt gemäß Anspruch 8, <u>dadurch gekennzeichnet</u>, daß das deletierte DNA-Fragment ein Antibiotika-Resistenzgen ist.

- 10. Genfallen-Konstrukt gemäß Anspruch 9, <u>dadurch gekennzeichnet</u>, daß das deletierte DNA-Fragment für ein Thymidin-Kinase-Neomycinphosphotransferase-Fusionsprotein kodiert.
- 11. Genfallen-Konstrukt gemäß Anspruch 10, <u>dadurch gekennzeichnet</u>, daß das deletierte DNA-Fragment für eine Neomycinphosphotransferase kodiert.
- 12. Genfallen-Konstrukt gemäß Anspruch 9, 10 oder 11, <u>dadurch gekennzeichnet</u>, daß der Promotor der Phosphoglyceratkinase (pgk)-Promotor ist.
- 13. Genfallen-Konstrukt gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 8 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß das deletierte DNA-Fragment von Targetsequenzen für die Rekombinase flankiert ist.
- 14. Genfallen-Konstrukt gemäß Anspruch 13, <u>dadurch gekennzeichnet</u>, daß die Targetseguenz loxP ist.
- 15. Genfallen-Konstrukt gemäß Anspruch 13, <u>dadurch gekennzeichnet</u>, daß die Targetsequenz frt ist.
- 16. Genfallen-Konstrukt gemäß Anspruch 13, 14 oder 15, <u>dadurch gekennzeichnet</u>, daß sich die Targetsequenzen in der U3 und/oder U5-Region befinden.
- 17. Verwendung des Genfallen-Konstrukts gemäß einem oder mehreren der vorstehenden Ansprüche für eine Identifizierung und/oder Isolierung von Genen, insbesondere transienten Genen.
- 18. Verwendung gemäß Anspruch 17 für eine Identifizierung und/oder Isolierung von den programmierten Zelltod, die DNA-Reparatur, die Differenzierung und/oder den Zellzyklus kontrollierenden Genen.

- 19. Zelle, vorzugsweise eine Säugetierzelle, enthaltend ein Genfallen-Konstrukt gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 15.
- 20. Säugetierzelle gemäß Anspruch 19, <u>dadurch gekennzeichnet</u>, daß sie von IL-3 abhängig ist, daß das erste Reportergen für Cre-Rekombinase kodiert, daß die Cre-Rekombinase ein vor dem zweiten Reportergen gelegenes DNA-Fragment deletieren kann, daß das deletierte Fragment für ein Thymidinkinase-Neomycin-phosphotransferase-Fusionsprotein (TKNeoPT) kodiert und von loxP-Targetsequenzen flankiert ist, daß das zweite Reportergen für IL-3 kodiert und nach Deletion des TKNeoPT-Gens stromabwärts des Phosphoglyceratkinase-Promotors zu liegen kommt.
- 21. Säugetierzelle gemäß Anspruch 20, <u>dadurch gekennzeichnet</u>, daß es eine hämatopoetische FDCP-1-Zelle oder eine totipotente Stammzelle ist.
- 22. Verwendung der Säugetierzelle gemäß Anspruch 19 für eine Identifizierung und/oder Isolierung von Genen, insbesondere transienten Genen.
- 23. Verwendung der Säugetierzelle gemäß Anspruch 19 oder 20 oder 21 für eine Identifizierung und/oder Isolierung von den programmierten Zelltod, die DNA-Reparatur, die Differenzierung und/oder den Zellzyklus kontrollierenden Genen.
- 24. Vektor, enthaltend das Genfallen-Konstrukt gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 16.
- 25. Kit zur Identifizierung und/oder Isolierung von Genen, insbesondere transienten Genen, enthaltend mindestens ein Genfallen-Konstrukt gemäß\_einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 16 und/oder einen Vektor nach Ansprüch 24.
- 26. Verfahren zur Identifizierung und/oder Isolierung von Genen, insbesondere transienten Genen, das die folgenden Schritte enthält:

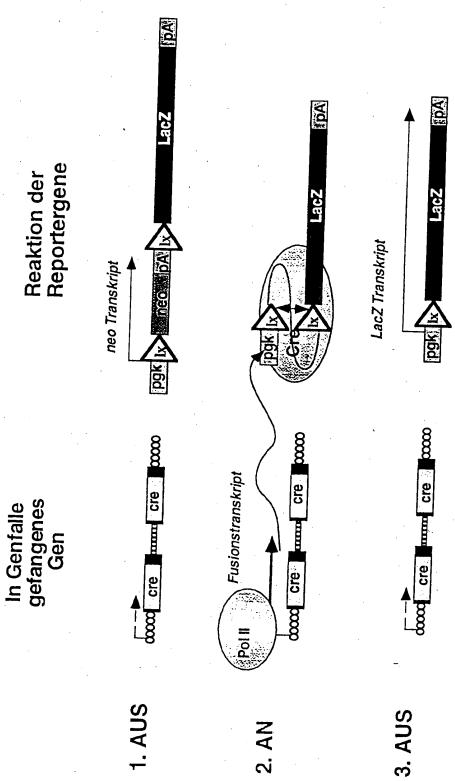
- Einbau eines Genfallen-Konstrukts nach einem der Ansprüche 1 bis 16 in eine geeignete Zelle;
- Selektion auf Zellen, bei denen das erste Reportergen in ein Gen, vorzugsweise nicht aktives Gen, eingebaut ist;
- Aktivierung des ersten Reportergens, vorzugsweise durch Initiation der Transkription des Gens, woraufhin das zweite Reportergen aktiviert wird; und
- Identifizierung und/oder Isolierung des Gens, in das das erste Reportergen eingebaut ist.
- 27. Verfahren gemäß Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, daß
- ein Genfallen-Konstrukt gemäß Anspruch 8 als erstes Reportergen das Cre-Rekombinase-Gen enthält, daß die Cre-Rekombinase ein stromabwärts vom zweiten Reportergen gelegenes Thymidinkinase-Neomycinphosphotransferase-Gen deletiert, wodurch das zweite Reportergen, das für IL-3 kodiert, neben einem Phosphoglyceratkinase-Promotor zu liegen kommt,
- das Genfallen-Konstrukt in eine IL-3-abhängige FDCP-1-Zelle eingeschleust wird,
- durch Anzucht ein Neomycin-Medium auf Zellen selektiert wird, die Cre-Rekombinase nicht produzieren,
- diese selektierten Zellen in IL-3-freiem Medium gezüchtet werden, so daß für den programmierten Zelltod verantwortliche Gene aktiviert werden,
- daß die überlebenden Zellen selektioniert werden und

- die für den programmierten Zelltod verantwortlichen Gene mit den bekannten Verfahren isoliert werden.
- 28. Verfahren gemäß Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, daß
- ein Genfallen-Konstrukt gemäß Anspruch 8 als erstes Reportergen das Cre-Rekombinase-Gen enthält, daß die Cre-Rekombinase ein stromabwärts vom zweiten Reportergen gelegenes Neomycinphosphotransferase-Gen deletiert, wodurch das zweite Reportergen, das für lacZ kodiert, neben einem Phosphoglyceratkinase-Promotor zu liegen kommt,
- das Genfallen-Konstrukt in eine totipotente embryonale Stammzelle eingeschleust wird,
- durch Anzucht auf G418 auf Zellen selektiert wird, die Cre-Rekombinase nicht produzieren,
- diese selektiven Zellen zum Differenzieren induziert werden, so daß differenzierungsspezifische Gene aktiviert werden,
- diese Zellen isoliert werden,
- diese Zellen in die Keimbahn eines Säugetiers eingeführt werden und dort für die Bildung von Geweben verantwortlich sind und
- die differenzierzungsspezifischen Gene mit den bekannten Verfahren isoliert werden.

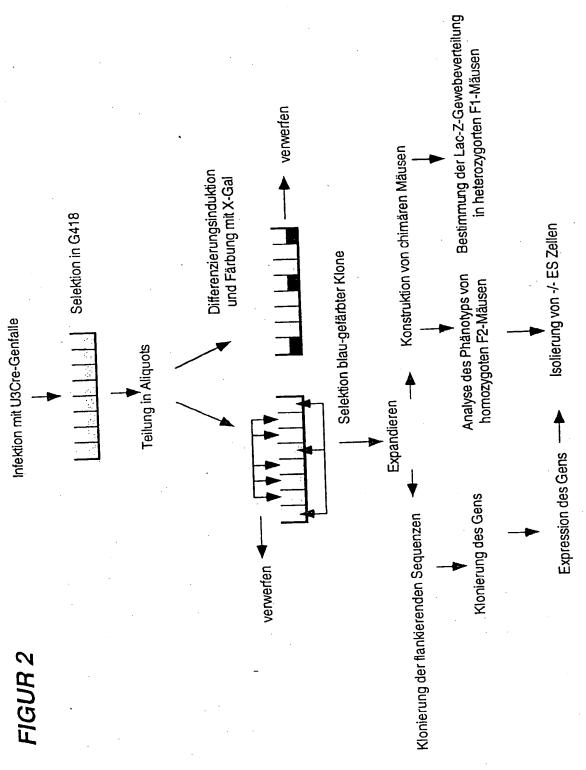


**ERSATZBLATT (REGEL 26)** 

FIGUR 1B

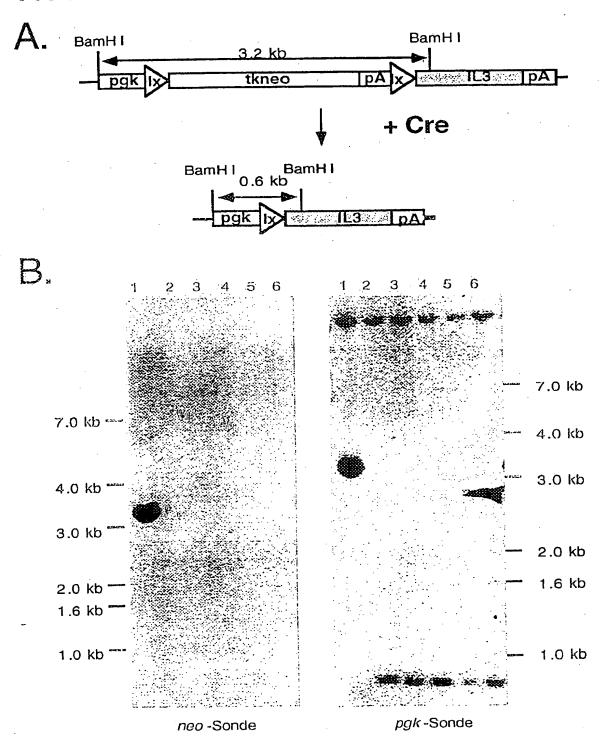


**ERSATZBLATT (REGEL 26)** 

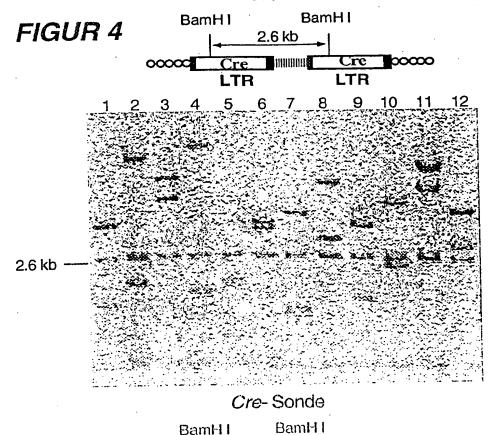


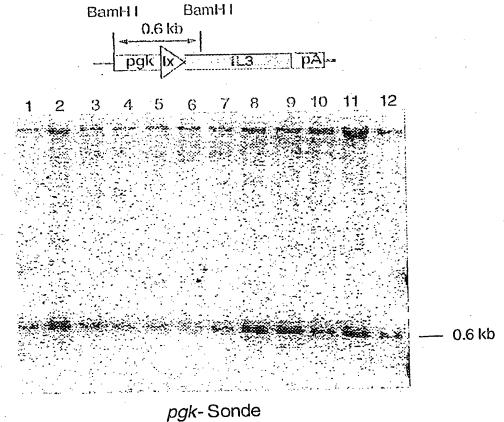
ERSATZBLATT (REGEL 26)

# FIGUR 3

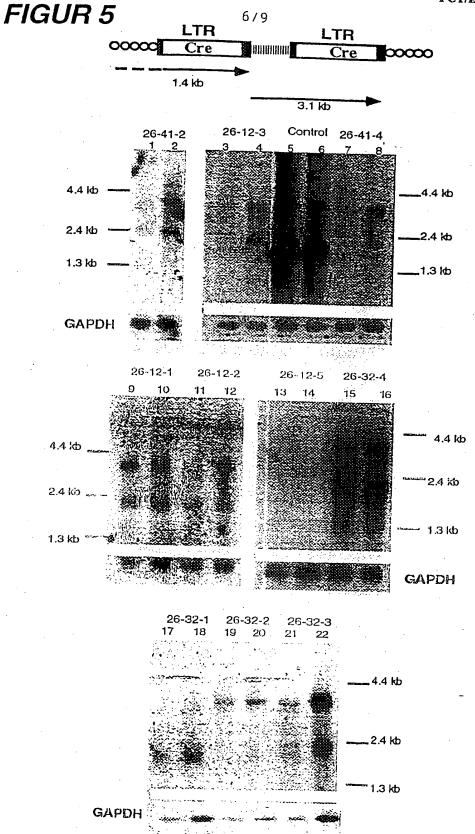


**ERSATZBLATT (REGEL 26)** 



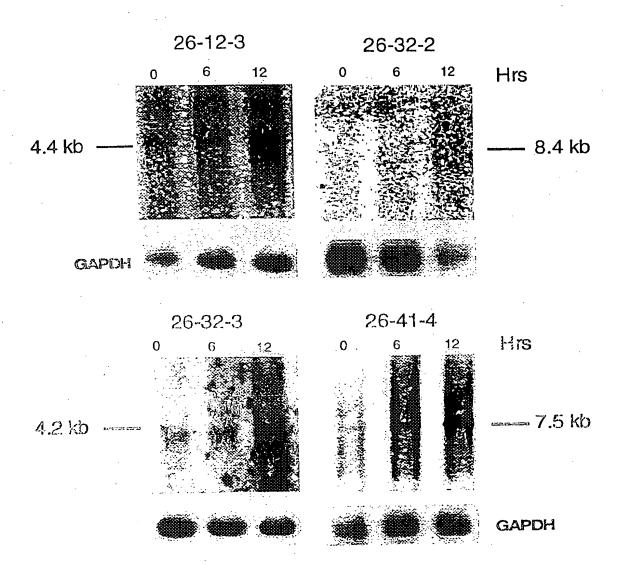


**ERSATZBLATT (REGEL 26)** 



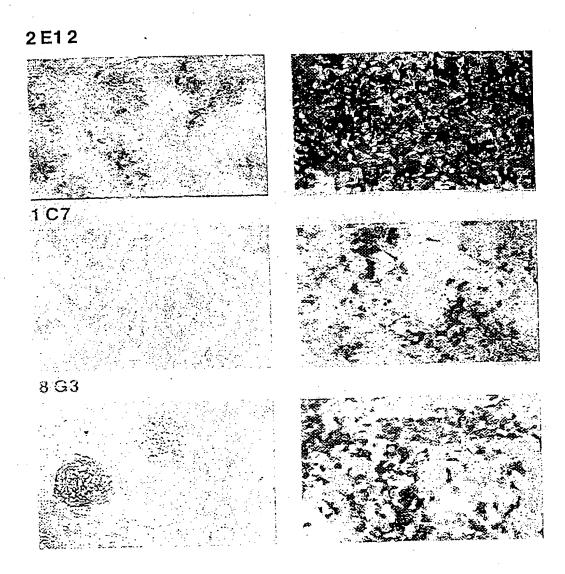
FRSATZBI ATT (REGEL 26)

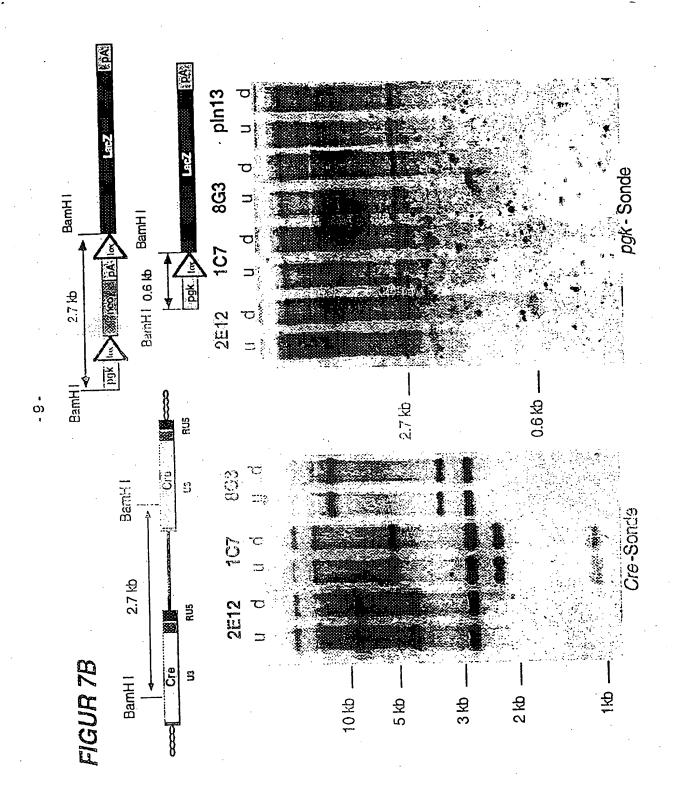
# FIGUR 6



**ERSATZBLATT (REGEL 26)** 

# FIGUR 7A.





ERSATZBLATT (REGEL 26)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

h rational Application No PCT/EP 97/06816

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C12N15/65 C12 C12Q1/68 C12N5/16 C12N15/85 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC **B. FIELDS SEARCHED** Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C12N C12Q Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT Relevant to claim No. Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages Category <sup>e</sup> 1,5,7,8, EP 0 731 169 A (UNIV EDINBURGH) 11 X 17-19, September 1996 22-26 see the whole document 1,5,7,8, 17-19, WO 97 39722 A (T CELL SCIENCES INC ; LIN AUGUSTINE Y T (US); UMLAUF SCOTT W (US);) P.X 22-26 30 October 1997 see the whole document 1 SKARNES W C: "THE IDENTIFICATION OF NEW Α GENES: GENE TRAPPING IN TRANSGENIC MICE" CURRENT OPINION IN BIOTECHNOLOGY, vol. 4, 1 January 1993, pages 684-689, XP000569473 see the whole document Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex. Special categories of cited documents : "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance cited to understand the principle or theory underlying the earlier document but published on or after the international "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to filing date involve an inventive step when the document is taken alone "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such docu-"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or ments, such combination being obvious to a person skilled in the art. document published prior to the international filing date but tater than the priority date claimed "&" document member of the same patent family Date of mailing of the international search report Date of the actual completion of the international search 3 0, 04, 98 27 March 1998 **Authorized afficer** Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Hillenbrand, G

Fax: (+31-70) 340-3016

1

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

II ational Application No PCT/EP 97/06816

Category *	lation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
Saragory .	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SKARNES W C ET AL: "A GENE TRAP APPROACH IN MOUSE EMBRYONIC STEM CELLS: THE LACZ REPORTER IS ACTIVATED BY SPLICING REFLECTS ENDOGENOUS GENE EXPRESSION AND IS MUTAGENIC IN MICE" GENES AND DEVELOPMENT, vol. 6, no. 6, 1 June 1992, pages 903-918, XP000569059 cited in the application see the whole document	1
	HILL D.P. ET AL: "Screening for novel pattern formation genes using *gene* *trap* approaches" METHODS ENZYMOL., 1993, 225/- (664-681), USA, XP002060450 cited in the application see the whole document	1

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members ,

tr ational Application No PCT/EP 97/06816

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date  14-11-96 18-07-96 11-07-96 26-11-96
EP 0731169 A	11-09-96	AU 673650 B AU 4087396 A CA 2166850 A JP 8308576 A	
W0 9739722 A	30-10-97	AU 2814897 A	12-11-97

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

, ationales Aktenzeichen
PCT/EP 97/06816

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung 14-11-96 18-07-96 11-07-96 26-11-96
EP 0731169 A	11-09-96	AU 673650 B AU 4087396 A CA 2166850 A JP 8308576 A	
WO 9739722 A	30-10-97	AU 2814897 A	12-11-97